

Aus der Medizinischen Kleintierklinik  
Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Katrin Hartmann

Angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. Katrin Hartmann

Genetische und nutritive Faktoren bei der Entstehung von Diabetes mellitus beim  
Hund: Untersuchungen zu Polymorphismen in vier Kandidatengenen und zur  
Vitamin-D-Versorgung

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Jannis Uhrig  
aus  
Karlsruhe

München 2007

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

|              |                                  |
|--------------|----------------------------------|
| Dekan:       | Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer |
| Referent:    | Univ.-Prof. Dr. Hartmann         |
| Korreferent: | Prof. Dr. Goldberg               |

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

*„We know what makes the flowers grow, but we don't know why –  
we all have the knowledge of DNA, but we still die”*

Justin Sullivan

*„Den Zweifel zur Lebensphilosophie zu erklären, das ist, als wählte man den  
Stillstand zum Transportmittel“*

Yann Martel

**In Erinnerung  
an meine Mutter**

# Inhaltsverzeichnis

|          |  |    |
|----------|--|----|
| I.       | Einleitung.....  | 1  |
| II.      | Literaturübersicht .....   | 2  |
| 1.       | Diabetes mellitus beim Hund.....                                   | 2  |
| 1.1.     | Anatomie des Pankreas.....   | 2  |
| 1.2.     | Histologie des Pankreas.....                                       | 3  |
| 1.3.     | Insulin .....  | 4  |
| 1.3.1.   | Insulinbildung und Insulinsekretion .....                          | 4  |
| 1.3.2.   | Insulinwirkung .....   | 5  |
| 1.4.     | Pathophysiologie des Insulinmangels .....                          | 5  |
| 1.4.1.   | Auswirkungen des Insulin- und Glukosemangels in der Zelle .....    | 5  |
| 1.4.2.   | Auswirkungen eines dauerhaft hohen Blutglukosespiegels.....        | 7  |
| 1.5.     | Epidemiologie des caninen Diabetes mellitus .....                  | 8  |
| 1.6.     | Klinische Aspekte des caninen Diabetes mellitus.....               | 9  |
| 1.6.1.   | Diagnose .....   | 9  |
| 1.6.2.   | Zugrundeliegende Erkrankungen .....                                | 10 |
| 1.6.2.1. | Akute und chronische Pankreatitis .....                            | 10 |
| 1.6.2.2. | Hyperadrenokortizismus .....                                       | 10 |
| 1.6.2.3. | Progesteronüberschuss.....   | 11 |
| 1.6.2.4. | Entzündungen und Neoplasien.....                                   | 11 |
| 1.6.3.   | Begleitkrankheiten und Spätfolgen .....                            | 11 |
| 1.6.3.1. | Pankreatitis.....  | 12 |
| 1.6.3.2. | Harnwegsinfektionen.....   | 12 |
| 1.6.3.3. | Infektionen der Haut und der Ohren.....                            | 12 |
| 1.6.3.4. | Katarakt.....  | 13 |
| 1.6.3.5. | Diabetische Nephropathie .....                                     | 13 |
| 1.6.3.6. | Diabetische Ketoazidose .....                                      | 14 |
| 1.7.     | Behandlung des caninen Diabetes mellitus .....                     | 15 |
| 1.7.1.   | Insulinarten .....   | 16 |
| 1.7.2.   | Beginn der Insulintherapie .....                                   | 17 |
| 1.7.3.   | Kontrolle des Behandlungserfolgs .....                             | 17 |
| 1.7.3.1. | Beurteilung eines Blutzuckertagesprofils .....                     | 18 |
| 1.7.3.2. | Somogyi-Effekt .....   | 19 |
| 1.7.3.3. | Fructosamin als Parameter für die Kontrolle der Hyperglykämie .... | 19 |
| 1.7.4.   | Langzeitmanagement des diabetischen Patienten .....                | 20 |
| 1.7.5.   | Fütterung des diabetischen Patienten .....                         | 21 |
| 1.8.     | Ätiologie des Diabetes mellitus .....                              | 22 |
| 1.8.1.   | Ätiologische Einteilung beim Menschen.....                         | 22 |
| 1.8.1.1. | Typ I Diabetes mellitus.....                                       | 22 |
| 1.8.1.2. | Typ II Diabetes mellitus.....                                      | 23 |
| 1.8.1.3. | Andere Formen des Diabetes mellitus .....                          | 23 |
| 1.8.2.   | Ätiologische Einteilung beim Hund .....                            | 24 |
| 1.8.2.1. | Insulin deficiency diabetes.....                                   | 24 |
| 1.8.2.2. | Insulin resistance diabetes.....                                   | 26 |
| 1.8.3.   | Genetische Ursachen des humanen Typ I Diabetes mellitus .....      | 28 |
| 1.8.3.1. | Einfluss des Human-Leukocyte-Antigen-Gens.....                     | 28 |
| 1.8.3.2. | Einfluss des Insulin-Gens .....                                    | 28 |
| 1.8.3.3. | Einfluss des Lymphoid-Tyrosin-Phosphatase-Gens.....                | 29 |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 1.8.3.4. | Einfluss des Cytotoxic-T-Lymphocyte-Antigen-4-Gens .....          | 29 |
| 1.8.3.5. | Einfluss des Vitamin-D-Rezeptor-Gens .....                        | 29 |
| 1.8.4.   | Genetische Ursachen beim Hund .....                               | 30 |
| 2.       | Entstehung von Autoimmunität .....                                | 31 |
| 2.1.     | Toleranzinduktion von T-Zellen .....                              | 31 |
| 2.2.     | Toleranzinduktion von B-Zellen .....                              | 32 |
| 2.3.     | Zusammenhang zwischen Diabetes und Autoimmunität .....            | 33 |
| 3.       | Vitamin D .....   | 34 |
| 3.1      | Vitamin-D-Bildung .....   | 34 |
| 3.2      | Vitamin-D-Regulation .....  | 35 |
| 3.3      | Vitamin-D-Wirkung .....   | 36 |
| 4.       | Zusammenhang zwischen Vitamin D, Autoimmunität und Diabetes ..... | 37 |
| III.     | Material & Methoden .....   | 39 |
| 1.       | Tiere .....   | 39 |
| 1.1.     | Hunde mit Diabetes mellitus .....                                 | 39 |
| 1.1.1.   | Diagnose .....  | 39 |
| 1.1.2.   | Altersstruktur .....  | 39 |
| 1.1.3.   | Rassen- und Geschlechtsverteilung .....                           | 40 |
| 1.1.4.   | Begleitkrankheiten .....  | 41 |
| 1.2.     | Kontrollgruppe .....  | 41 |
| 2.       | Methoden .....  | 42 |
| 2.1.     | Probenentnahme .....  | 42 |
| 2.2.     | DNA-Isolation .....   | 43 |
| 2.3.     | 25(OH)Vitamin-D <sub>3</sub> -Bestimmung .....                    | 43 |
| 2.4.     | 1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D <sub>3</sub> -Bestimmung .....    | 43 |
| 2.5.     | Sequenzierung der Kandidatengene .....                            | 43 |
| 2.5.1.   | Polymerasekettenreaktion .....                                    | 46 |
| 2.5.2.   | Aufreinigung der PCR-Produkte .....                               | 46 |
| 2.6.     | Auffinden von Single Nucleotide Polymorphisms .....               | 47 |
| 2.7.     | Genotypisierung aller Individuen .....                            | 47 |
| 2.7.1.   | Amplification Refractory Mutation System-PCR .....                | 47 |
| 2.7.2.   | Primer-Probe-Assay .....  | 52 |
| 2.7.3.   | Meltingcurve-PCR .....  | 53 |
| 2.8.     | Statistik .....   | 55 |
| IV.      | Ergebnisse .....  | 56 |
| 1.       | Sequenzierung .....   | 56 |
| 1.1.     | Sequenzierung Vitamin-D-Rezeptor-Gen .....                        | 56 |
| 1.2.     | Sequenzierung Cytotoxic-T-Lymphocyte-Antigen-4-Gen .....          | 56 |
| 1.3.     | Sequenzierung Lymphoid-Tyrosin-Phosphatase-Gen .....              | 57 |
| 1.4.     | Sequenzierung Dog Leukozyte Antigen DQA1-Locus .....              | 58 |
| 2.       | Allelfrequenzen .....   | 59 |
| 3.       | Allelfrequenzen Dog Leukocyte Antigen DQA1-Locus .....            | 59 |
| 4.       | Vitamin-D-Spiegel .....   | 61 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.5.  | Messung der 25(OH)Vitamin-D <sub>3</sub> -Spiegel .....                    | 61 |
| 4.6.  | Messung der 1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D <sub>3</sub> -Spiegel .....    | 62 |
| V.    | Diskussion.....  | 64 |
| 1.    | Vergleich der Genotypisierungsmethoden .....                               | 64 |
| 2.    | Ätiologie des Diabetes mellitus bei Mensch und Hund .....                  | 65 |
| 2.2   | Genetische Faktoren für die Entstehung von Diabetes mellitus .....         | 65 |
| 2.3   | Vitamin-D-Status als nutritiver Faktor für das Entstehen von Diabetes..... | 68 |
| 3.    | Limitationen dieser Studie.....  | 69 |
| 3.1.  | Tierzahl .....   | 70 |
| 3.2.  | Patientenkollektiv .....   | 70 |
| 3.3.  | Kontrollgruppe .....   | 71 |
| 3.4.  | Studiendesign .....  | 72 |
| 4.    | Relevanz der vorliegenden Studie.....                                      | 72 |
| 5.    | Ausblick.....  | 73 |
| VI.   | Zusammenfassung .....  | 76 |
| VII.  | Summary .....  | 78 |
| VIII. | Literaturverzeichnis .....   | 80 |

## **Alphabetisches Verzeichnis der Abkürzungen**

7-DHC: 7-Dehydrocholesterol  
ADA: American Diabetes Association  
AGE: Advanced Glycosylated Endproduct  
ALP: Alanin-Aminotransferase  
AP: Alkalische Phosphatase  
APC: antigenpräsentierende Zelle  
ARMS: Amplification Refractory Mutation System  
CTLA4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4  
C<sub>t</sub>: Cycle Threshold  
DDG: Deutsche Diabetes-Gesellschaft  
DKA: diabetische Ketoazidose  
DLA: Dog Leukozyte Antigen  
D. m.: Diabetes mellitus  
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure  
EPI: exokrine Pankreasinsuffizienz  
GAD65: Glutamat-Dekarboxylase  
GH: Growth Hormone  
HGVS: Human Genome Variation Society  
HLA: Human Leukocyte Antigen  
IA-2/ICA-512: Tyrosin-Phosphatase  
IBD: Inflammatory Bowel disease  
ICA: Islet Cell Antigen  
IDD: Insulin Deficiency Diabetes  
IDDM: Insulin-dependent Diabetes Mellitus  
IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$   
IL-2: Interleukin-2  
IRD: Insulin Resistency Diabetes  
ISAG: International Society for Animal Genetics  
LADA: Latent Autoimmune Diabetes in Adults  
LYP: Lymphoid-Tyrosin-Phosphatase  
MHC: Major Histocompatibility Complex  
MODY: Maturity Onset Diabetes of the Young  
MS: Multiple Sklerose

NADPH: reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid

NIDDM: Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus

NO: Stickoxid

OR: Odds Ratio

NPH: Isophan-Insulin

PCR: Polymerase Chain Reaction

PP: pankreatisches Polypeptid

PTH: Parathormon

PZI: Protamin-Zink-Insulin

RXR: Retinoid X Rezeptor

SD: Standardabweichung

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

T1DM: Typ I Diabetes mellitus

TBE: TRIS-Borat-EDTA

TE: TRIS-EDTA

TGF- $\beta$ : Transforming Growth Faktor  $\beta$

TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor- $\alpha$

VDR: Vitamin-D-Rezeptor

VDRE: Vitamin D Responsive Elements

VIP: vasoaktives intestinales Polypeptid

VUW: Veterinärmedizinische Universität Wien

WHO: World Health Organisation



## **I. Einleitung**

Diabetes mellitus ist eine der häufigsten endokrinen Erkrankungen des Hundes (GUPTILL et al., 2003), und trotz steigender Prävalenz sind die genetischen Hintergründe weiterhin ungeklärt (RAND et al., 2004). Auch steht eine Klassifizierung des caninen Diabetes mellitus analog der menschlichen Einteilung in immunmedierten, durch Zerstörung der  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas induzierten (humaner Typ I) einerseits und durch periphere Insulinresistenz und erst nachfolgender Zerstörung der  $\beta$ -Zellen durch Erschöpfung ihrer Sekretionskapazität und Glukosetoxizität (humaner Typ II) andererseits, noch aus (GALE, 2005).

In der Humanmedizin wurden auf genetischer Ebene eine Vielzahl von Polymorphismen (Variationen der Nukleotidsequenz) identifiziert, deren Unterschiede in den Allelfrequenzen einen statistischen Zusammenhang mit Typ I Diabetes aufweisen (GILLESPIE, 2006). Bei Hunden wurde ein Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und einem genetischen Polymorphismus erst in einem Fall gefunden (CATCHPOLE et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit sollen einige Genorte des Hundegenoms, deren Homologe beim Menschen bereits untersucht wurden, auf das Vorliegen von Polymorphismen auf genetischer Ebene untersucht werden. Es soll der eventuelle statistische und kausale Zusammenhang dieser Polymorphismen mit Diabetes mellitus beim Hund untersucht werden.

Seit einigen Jahren gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass Typ I Diabetes und andere Autoimmunkrankheiten durch Vitamin-D-Mangel ausgelöst werden können (CANTORNA & MAHON, 2004). Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit auch der Vitamin-D-Haushalt gesunder Kontrolltiere mit dem an Diabetes mellitus erkrankter Hunde verglichen werden.

## **II. Literaturübersicht**

### **1. Diabetes mellitus beim Hund**

Insulin wird in den  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) gebildet und wird im Körper zur Aufnahme von Glukose aus dem Blut in die Körperzellen benötigt. Insulin senkt den Blutzuckerspiegel und reguliert diesen im Zusammenspiel mit seinen Antagonisten Glukagon, den Katecholaminen Adrenalin und Noradrenalin sowie Glukokortikoiden und dem Wachstumshormon (growth hormone, GH). Mit Ausnahme der Zellen des zentralen Nervensystems (BETZ et al., 1976) benötigen alle Zellen des Körpers Insulin, um Glukose, das Hauptsubstrat der Energiegewinnung, in ausreichender Menge in die Zellen aufnehmen zu können. Fehlt dieses Hormon, kommen zwei verschiedene Pathomechanismen in Gang und führen zum klinischen Bild eines Diabetes mellitus. Einerseits fehlt die Glukose in den Körperzellen zur Energiegewinnung, andererseits führt ein dauerhaft zu hoher Blutglukosespiegel zu schweren Folgeschäden an vielen Organsystemen. Ein Mangel an Insulin kann einerseits durch eine zu geringe oder fehlende Sekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas zustande kommen und somit „absolut“ sein, andererseits durch eine periphere Insulinresistenz bedingt sein, die den Bedarf an Insulin erhöht und so zu einem „relativen“ Mangel dieses Hormons führt. Beide Formen kommen bei vielen Säugetierspezies einschließlich des Menschen und des Hundes vor (RUOFF et al., 1986; STOKES, 1986; TANIYAMA et al., 1993; RAND et al., 2004; KAPLAN & WAGNER, 2006), und trotz teils unterschiedlicher Pathogenese führen beide Mechanismen zum gleichen klinischen Bild des Diabetes mellitus (D. m.) mit den Kardinalsymptomen Polydipsie, Polyurie, Polyphagie und Gewichtsverlust. Unbehandelt kann D. m. zur diabetischen Ketoazidose (DKA) und schließlich zum Tode führen (ROCHE et al., 2005).

#### **1.1. Anatomie des Pankreas**

Die Bauchspeicheldrüse besteht aus einem exokrinen Anteil, der den fermenthaltigen, zur Fett-, Kohlenhydrat- und Eiweißverdauung dienenden Pankreassaft absondert und über einen oder mehrere Ausführungsgänge mit dem Duodenum verbunden ist, und einem endokrinen Anteil, der aus den Langerhans'schen Inseln besteht und durch ein dichtes Kapillarnetz an den Blutkreislauf angebunden ist. Beim Hund besteht das Pankreas aus einem kurzen Körper, Corpus pancreatis, im Bereich der Pars cranialis duodeni und zwei nach

kaudal verlaufenden Lappen, dem linken Lappen (Lobus pancreatis sinister), der, den Pylorusteil des Magens begleitend, an Leber und Colon transversum stößt und meist die linke Niere erreicht, sowie dem rechten Lappen (Lobus pancreatis dexter), der etwas länger und schlanker als der linke ist und parallel zur Pars descendens duodeni nach kaudal verläuft und das Zäkum erreichen kann (SCHUMMER & HABERMEHL, 1995).

### **1.2. Histologie des Pankreas**

Die zwei unterschiedlichen Funktionen des Pankreas spiegeln sich auch im unterschiedlichen histologischen Aufbau seiner beiden Anteile wieder. Während der exokrine Anteil in seiner Morphologie der Ohrspeicheldrüse ähnelt, liegt der endokrine Anteil in ovalen bis runden Zellhaufen im exokrinen Gewebe verteilt und besitzt keine Ausführungsgänge. Der exokrine Anteil (Pars exocrina pancreatis) ist eine tubuloazinöse seröse Drüse, deren Sekret in Zymogengranula gespeichert wird. Mehrere proteinsynthetisierende Drüsenzellen bilden ein Endstück (Azinus), das über ein Schaltstück (Ductus intercalatus) an das Ausführungsgangsystem des Pankreas angeschlossen ist. Die Schaltstücke münden in intralobuläre Ausführungsgänge (Ductus interlobulares), die zu interlobären Ausführungsgängen zusammenfließen und schließlich über zwei Ausführungsgänge (Ductus pancreatici) ins Duodenum münden. Im Hungerzustand werden in den Drüsenzellen viele Zymogengranula gebildet, die nach Futteraufnahme (stimuliert durch den Nervus vagus und die Hormone Gastrin, Sekretin und Cholezystokinin) ihr (noch inaktives) Sekret *via* Exozytose in das Schaltstück entleeren. Erst die Enzyme der Darmschleimhaut aktivieren die Bestandteile des Pankreasfermentes durch tryptische Spaltung. Der endokrine Anteil (Pars endocrina pancreatis) besteht aus 1 - 2 Millionen Zellhaufen von 100 - 500  $\mu\text{m}$  Größe und etwas hellerer Farbe, den sogenannten Langerhans'schen Inseln (Insulae pancreaticae), die im exokrinen Gewebe verstreut liegen. Circa 5 - 30 % der Inselzellen sind  $\alpha$ -Zellen, die Glukagon produzieren und mit Silber anfärbbare, elektronenmikroskopisch dichte Granula enthalten, sowie einen stark gekerbten Kern besitzen.  $\beta$ -Zellen sezernieren Insulin, sind größer als  $\alpha$ -Zellen und machen etwa 60-80 % der Population an Inselzellen aus. Ihre Granula weisen im Elektronenmikroskop eine kristalline Innenstruktur auf. Die Rolle der C-Zellen, die keine Granula erkennen lassen, in den Langerhans'schen Inseln ist unklar, möglicherweise handelt es sich um undifferenzierte Stammzellen oder um inaktive  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Zellen.  $\delta$ -Zellen produzieren Somatostatin, das in unter dem

Elektronenmikroskop homogen opaken, kleinen Granula gespeichert wird und machen etwa 5 % der Inselzellen aus. Die kleinste und sehr heterogene Gruppe der endokrinen Pankreaszellen, die PP-Zellen, sezernieren gastroenteropankreatische Polypeptidhormone, zum Beispiel das Pankreas-Polypeptid (PP) oder das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP). Die endokrinen Zellen des Pankreas sind von einem dichten Netz von fenestrierten Kapillaren umgeben und geben ihr Sekret durch Exozytose an den Blutkreislauf ab. Sie sind in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung nicht zu unterscheiden, lassen sich jedoch sehr gut anhand der immunhistochemischen Färbung der von ihnen gebildeten Hormone identifizieren (MOSIMANN & KOHLER, 1990; SINOWATZ, 2000; BÖCK & LIEBICH, 2004).

### **1.3. Insulin**

Insulin ist ein Peptidhormon mit großer Homologie zwischen den verschiedenen Säugetierspezies. Hundeinsulin ist in seiner Sequenz identisch mit Schweineinsulin ([www.ebi.ac.uk/swissprot](http://www.ebi.ac.uk/swissprot)). Es wirkt über seinen Rezeptor sowohl auf die Glukosehomöostase als auch auf den Metabolismus von Fetten, Proteinen und Ketonkörpern.

#### **1.3.1. Insulinbildung und Insulinsekretion**

Insulin wird als prä-pro-Insulin in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas gebildet und besteht beim Hund aus 106 Aminosäuren, die eine Signalsequenz sowie eine A- und eine B-Kette bilden, die von einem Zwischenglied, dem sogenannten C-Peptid verbunden werden. Durch Abspaltung der Signalsequenz und Bildung von drei Disulfidbrücken wird das aus 82 Aminosäuren bestehende Proinsulin gebildet. Im weiteren Verlauf wird das C-Peptid abgespalten und das so entstandene, beim Hund aus 51 Aminosäuren bestehende Insulin (SMITH, 1966) als Hexamer an ein Zinkion gebunden in Granula an der Zelloberfläche gespeichert und als Reaktion auf einen steigenden Blutzuckerspiegel zusammen mit dem C-Peptid in äquimolaren Mengen in den Blutkreislauf sezerniert. Da die Bildung von Insulin aus seinen Vorläufern durch sogenannte Prohormon-Konvertasen erst in den Speichergranula geschieht, wird bei rascher Insulinsekretion auch Proinsulin in den Blutkreislauf ausgeschüttet; es hat jedoch wenig biologische Aktivität. Weiterhin gelangen verschiedenste Proteine aus den Granula in die Zirkulation. Den meisten wird eine Rolle beim Herstellen optimaler Speicher- und Prozessierungsbedingungen für das Insulin zugeschrieben. Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass einige von ihnen auch biologische Aktivität zeigen. Eines

davon, das Amylin kann zur Zerstörung von  $\beta$ -Zellen durch Amyloid-Ablagerungen bei Insulinresistenz und nachfolgender Hypersekretion führen (GOODMAN, 2003).

### **1.3.2. Insulinwirkung**

Insulin vermittelt über seinen Rezeptor und nachfolgende Aktivierung sogenannter „second messenger“ sowohl kurzfristige als auch längerfristige Wirkungen. Der Insulinrezeptor besteht aus zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Untereinheiten. Diese aktivieren durch Phosphorylierung Substrate der Signaltransduktionskaskade in der Zelle. Eins der wichtigsten Substrate, die aktiviert werden ist die Phosphatidyl-Inositol-3-(PI-3)-Kinase. Sie ist hauptverantwortlich für die Translokation von GLUT 4-Glukosetransportermolekülen aus dem Zytoplasma an die Zellmembran und damit für die Aufnahme von Glukose in die Zelle sowie für die Zunahme der Glykogensynthese. Eine weitere über second-messenger-Kaskaden vermittelte Insulinwirkung ist die Förderung der Proteinsynthese. Langfristig reguliert Insulin über bisher kaum bekannte Regulationsproteine die Expression von mehr als 150 Genen. Insulin bewirkt insgesamt also eine Aufnahme von Glukose aus dem Blut in die Zellen, eine Zunahme der Glykogen- und Proteinsynthese in der Zelle sowie die Expression vieler verschiedener, bisher nicht vollständig charakterisierter Gene hauptsächlich des anabolen Stoffwechsels (CHEATHAM & KAHN, 1995; GOODMAN, 2003).

### **1.4. Pathophysiologie des Insulinmangels**

Nicht nur die direkten Auswirkungen eines Insulinmangels auf den Lipid-, Protein- und Glukosemetabolismus in der Zelle, sondern auch der intrazelluläre Glukosemangel und die Folgen der Hyperglykämie sind für die klinischen Symptome des D. m. und der DKA verantwortlich.

#### **1.4.1. Auswirkungen des Insulin- und Glukosemangels in der Zelle**

Durch den Mangel an Insulin fehlt das Signal zur Translokation von GLUT4-Glukosetransportern aus dem Cytosol an die Zellmembran von Muskelzellen, Adipozyten und Leberzellen. Dadurch ist eine Glukoseaufnahme in diese Zellen nur noch in sehr geringem Ausmaß möglich. Unabhängig vom Blutglukosespiegel oder dem Vorhandensein von Glukose in der Zelle wirkt Insulin hemmend auf die Lipolyse und die Ketogenese (SONKSEN & SONKSEN, 2000).

In der Leber wird physiologischerweise Glukose in Glykogen umgewandelt und zur Energiespeicherung verwendet. Liegt ausreichend Glukose in der Zelle vor,

wird unter Insulineinfluss ein Teil der Glukose und der mit der Nahrung aufgenommenen Lipide in Triacylglycerin umgewandelt, das der Fettspeicherung dient. Fehlt nun Glukose in der Leberzelle und überwiegen insulinantagonistische Hormone, kommt es in der Leberzelle zur Glukoneogenese aus Aminosäuren, zur Glykogenolyse und zur gesteigerten  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren. Hierbei entsteht vermehrt Acetyl-CoA, welches normalerweise zusammen mit Oxalazetat dem Citratzyklus zugeführt wird und somit zur Energiegewinnung dient. Da bei Glukosemangel die Zwischenprodukte des Citratzyklus der Glukoneogenese dienen und damit zuwenig Oxalazetat vorhanden ist, kann das Acetyl-CoA nicht dem Citratzyklus zugeführt werden und wird zu Ketonkörpern metabolisiert (LEHNINGER et al., 1994; LÖFFLER, 2005).

In der Muskelzelle wird nicht sofort verbrauchte Glukose unter Insulineinfluss zu Glykogen metabolisiert. Da das Muskelgewebe etwa 50 % der Körpermasse ausmacht, sind die Muskelzellen für den größten Anteil der durch Insulinausschüttung aus dem Blut entnommenen Glukose verantwortlich. Fehlt nun Glukose als Brennstoff in der Zelle und Insulin als anaboles Hormon, werden freie Fettsäuren und nach einiger Zeit Ketonkörper zur Energiegewinnung herangezogen, und Muskelproteine werden abgebaut, um in der Leber der Glukoneogenese zugeführt zu werden (GOODMAN, 2003).

In Adipozyten führt ein Mangel an Glukose und Insulin zur Hemmung der Triacylglycerinsynthese und Steigerung der Lipolyse mit Freisetzung von Glycerin und nichtveresterten Fettsäuren ins Blut, die in der Leber zu den Ketonkörpern Azeton, Azetoazetat und  $\beta$ -Hydroxybutyrat verstoffwechselt werden. Ketonkörper können als alternative Energiequelle im Gehirn und in der Muskelzelle fungieren. Ihr Vorhandensein im Blut kann jedoch aufgrund ihrer Funktion als schwache Säuren zur metabolischen Azidose führen und in höheren Konzentrationen zu einer schweren Stoffwechselentgleisung, der DKA. Diese kann zum diabetischen Koma und unbehandelt zum Tode führen (SONKSEN & SONKSEN, 2000)

Die einzigen Zellen des Hundehirns, die zur Glukoseaufnahme Insulin benötigen, sind die des Sättigungszentrums in der ventromedialen Region des Hypothalamus. Unter physiologischen Bedingungen hemmen sie das Fütterungszentrum in der lateralen Region des Hypothalamus, solange der Blutzuckerspiegel ausreichend hoch ist. Das Fütterungszentrum ist verantwortlich für die Regulation des Fressverhaltens. Es ist dauernd aktiv und kann nur

vorübergehend durch das Sättigungszentrum gehemmt werden. Je mehr Glukose in die Zellen des Sättigungszentrums gelangt, desto weniger tritt ein Hungergefühl auf. Bei relativem oder absolutem Insulinmangel gelangt nur wenig Glukose in die Zellen des Sättigungszentrums, so dass keine Hemmung des Fütterungszentrums auftritt und trotz Hyperglykämie ein dauerndes, beim Hund zur Polyphagie führendes Hungergefühl auftritt (FELDMAN & NELSON, 2004).

#### **1.4.2. Auswirkungen eines dauerhaft hohen Blutglukosespiegels**

Die Blutglukose wird in der Niere frei durch das Glomerulum filtriert und im proximalen Tubulus rückresorbiert (SILVERMAN & TURNER, 1992). Die Rückresorptionskapazität der Tubuli liegt beim Hund bei 10 - 12 mmol/l. Dieser Wert wird als „Nierenschwelle“ bezeichnet. Wird diese Glukosekonzentration im Blut überschritten, tritt die überschüssige Glukose in den Urin über. Dort bindet sie durch ihre osmotische Wirksamkeit Wasser und verhindert im distalen Tubulus und in den Sammelrohren die Rückresorption von Wasser ins Blutgefäßsystem des Nierenmarks. Diese osmotische Diurese führt zur Polyurie und zu einer kompensatorischen Polydipsie. Eine Iso- oder Hyposthenurie liegt trotz der großen Produktion verdünnten Urins normalerweise nicht vor, da die mit ausgeschiedene Glukose das spezifische Gewicht des Urins erhöht (HESS et al., 2000).

Die Glukosurie und die osmotische Diurese entziehen dem Körper nicht nur Energie in Form von Glukose, sondern es werden auch Natrium- und Chloridionen mit ausgeschwemmt, so dass dem Körper diese Elektrolyte entzogen werden. Die Natrium-Blutspiegel bleiben jedoch über lange Zeit konstant, da das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zur erhöhten Natriumrückresorption an den Nierentubuli führt. Aldosteron hingegen führt zu einer verminderten Kaliumrückresorption, so dass es auf Dauer zu einer Verarmung des Körpers an Natrium und Kalium kommt (HESS et al., 2000; SONKSEN & SONKSEN, 2000).

Glukose kann durch eine irreversible, nicht enzymatisch katalysierte Reaktion an Proteine und Nukleinsäuren kovalent binden. Diese sogenannte Glykierung, auch als Maillard-Reaktion bezeichnet (RAHBAR, 2005), führt zur Bildung von „advanced glycosylated endproducts“ (AGEs) (CERAMI et al., 1988). Eine dauerhaft zu hohe Blutglukose führt dann zu einem Überschuss an AGEs, die unter anderem Serumproteine an die extrazelluläre Matrix binden und so zu Schäden an den Gefäßen im Gehirn, im Herzen und den peripheren Kapillaren

sowie zur Verengung der Kapillaren im Glomerulum und der Retina führen können. Diese biochemische Reaktion trägt vermutlich zu einem großen Teil der beim Menschen bekannten und gefürchteten Langzeitschäden des D. m. wie Arteriosklerose, diabetische Nephropathie und diabetische Retinopathie bei (VLASSARA et al., 1986).

Da alle diese Komplikationen sich erst im Laufe mehrerer Jahrzehnte ausbilden, sind sie für den Hund klinisch weniger bedeutsam (FELDMAN & NELSON, 2004). Die für den Hund relevanten Spätfolgen des D. m. werden in Abschnitt 1.6.3. abgehandelt. Bei normalen Blutzuckerspiegeln werden nur etwa 3 % der Glukose über den sogenannten Sorbitol-Weg durch das Enzym Aldose-Reduktase zu Sorbitol und schließlich zu Fruktose abgebaut. Im hyperglykämischen Zustand erhöht sich dieser Wert auf bis zu 30 %. Da beim Abbau von Glukose über den Poly-Inositol-Weg NADPH (reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) verbraucht wird, entsteht in der Zelle ein NADPH-Mangel. NADPH ist ein Substrat für die Glutathion-Peroxidase, die die Zelle vor freien Radikalen und damit vor Schädigung durch oxidativen Stress schützt. Auf diesem Weg könnte eine erhöhte Aktivität der Aldose-Reduktase, von der vermutet wird, dass sie auch an der Bildung von AGEs beteiligt ist, zur Schädigung von Gefäßendothelien und damit zu den oben genannten Komplikationen des D. m. beim Menschen beitragen (SRIVASTAVA et al., 2005). Auch diese Mechanismen scheinen beim caninen D. m. aufgrund der kurzen Lebensspanne des Hundes von untergeordneter Bedeutung zu sein, der Sorbitol-Weg scheint jedoch bei der Bildung von diabetischen Katarakten sowohl beim Hund als auch beim Menschen eine wichtige Rolle zu spielen (LIGHTMAN, 1993; WILKIE et al., 2006).

### **1.5. Epidemiologie des caninen Diabetes mellitus**

Laut einer US-amerikanischen Studie, die über die Jahre 1970 - 1999 retrospektiv die Rassenverteilung von Hunden mit D. m. mit der Rassenverteilung von Hunden, die aus anderen Gründen an derselben Klinik vorgestellt wurden, verglich, hatten zwölf Rassen ein besonders hohes Risiko, einen D. m. zu entwickeln (Australischer Terrier, Mittelschnauzer, Samoyede, Zwergschnauzer, Fox Terrier, Keeshond, Bichon Frise, Finnenspitz, Cairn Terrier, Zwergpudel, Sibirischer Husky, Toy-Pudel). Die Mehrzahl der Hunde war zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen fünf und zehn Jahren alt, die höchste Prävalenz hatte D. m. in der Altersklasse zwischen elf und 15 Jahren (GUPTILL et al., 2003).



Eine andere US-amerikanische Studie, die 221 Hunde mit D. m. mit allen Hunden (insgesamt 42882) der gleichen Rasse, die im selben Zeitraum (1993 - 1998) aus anderen Gründen vorgestellt wurden, verglich, kam zu einem ähnlichen Ergebnis. Hier waren die Rassen mit einem erhöhten Diabetes-Risiko Samoyede, Zwergschnauzer, Zwergpudel, Mops sowie Toy-Pudel (HESS et al., 2000). In der englischen Hundepopulation konnten zehn Rassen mit einem erhöhten Diabetes-Risiko festgestellt werden (Samoyede, Tibet Terrier, Cairn Terrier, Yorkshire Terrier, Zwergschnauzer, Border Terrier, Zwergpudel, Border Collie, Cavalier King Charles Spaniel und Westhighland White Terrier). Hier lag der Median des Alters bei Erstdiagnose bei 9 Jahren, die Prävalenz von D. m. war 0,32 % . Die Neuerkrankungen wiesen ein saisonales Muster auf, in den Wintermonaten wurde D. m. häufiger diagnostiziert als in den Sommermonaten; im Januar traten mit Abstand am meisten Neuerkrankungen auf (CATCHPOLE et al., 2005; DAVISON et al., 2005). In allen drei Studien wurden übereinstimmend Boxer, Deutscher Schäferhund und Golden Retriever als Rassen mit einem besonders niedrigen Diabetes-Risiko erkannt (HESS et al., 2000; GUPTILL et al., 2003; CATCHPOLE et al., 2005). Für Deutschland liegen bislang keine Daten zur Rassenverteilung, Prävalenz und zum Alter der Erstdiagnosestellung vor.

### **1.6. Klinische Aspekte des caninen Diabetes mellitus**

Hunde mit D. m. werden in der Kleintierpraxis meist wegen der für den Besitzer unter Umständen sehr lästigen Polyurie und der auffälligen Polydipsie vorgestellt. Gewichtsabnahme trotz guter Futteraufnahme ist ebenfalls ein häufiger Vorstellungsgrund , die meistens ebenfalls bestehende Polyphagie stellt hingegen für die wenigsten Hundebesitzer einen Grund dar, den Tierarzt zu konsultieren. Sie wird häufig nicht als Krankheitssymptom wahrgenommen (PLOTNICK & GRECO, 1995).

#### **1.6.1. Diagnose**

Diagnostiziert wird D. m. beim Hund durch die Kombination aus den eben bereits genannten Leitsymptomen Polydipsie/Polyurie mit den typischen Laborbefunden. Eine persistente Nüchternhyperglykämie in Kombination mit Glukosurie ist beweisend für D. m. (GRECO, 2001). Die persistente Nüchternhyperglykämie kann durch wiederholte Blutglukosemessungen oder, einfacher, durch die Messung des Fruktosamin-Wertes dokumentiert werden. Fruktosamin wird durch die irreversible Glykierung von Serum-Albumin gebildet und repräsentiert beim Hund den Blutzuckerspiegel der letzten acht bis zehn Tage (REUSCH et al.,

1993). Da bei Insulinmangel durch eine verstärkte Lipolyse im Blut vermehrt freie Fettsäuren anfallen, ist Hyperlipidämie ein häufig zu beobachtender Laborbefund. Die Hyperlipidämie führt zu einer verstärkten Fetteinlagerung in die Leber und damit zu einer hepatischen Lipidose (JAMES & DAY, 1999). Diese führt zur Erhöhung der Aktivität der Leberenzyme Alkalische Phosphatase (AP) und Alanin-Aminotransferase (ALT). In einer Studie mit 208 Hunden mit D. m. wiesen 90 % aller Hunde eine Erhöhung der Aktivität der AP und 78 % eine Erhöhung der Aktivität der ALT auf, bei 42 % der Hunde war das Serum lipämisch (HESS et al., 2000).

### **1.6.2. Zugrundeliegende Erkrankungen**

Hormonelle Einflüsse, Medikamentengaben und Erkrankungen des Pankreas sowie anderer Organe können zum D. m. führen. Prinzipiell ist ein auf Insulinresistenz beruhender D. m. reversibel, und in den Fällen, in denen ein Hyperadrenokortizismus oder ein erhöhter Insulinbedarf im Diöstrus vorliegen, kann manchmal durch rechtzeitige Behandlung der Grundkrankheit bzw. sofortige Kastration der Übergang von einem transienten zu einem dauerhaft manifesten D. m. vermieden werden. In den meisten Fällen sind jedoch bereits zu viele  $\beta$ -Zellen durch Glukosetoxizität oder Erschöpfung ihrer Sekretionskapazität zugrundegegangen, um eine ausreichende Insulinsekretion aufrecht zu erhalten, so dass aus dem reversiblen, auf Insulinresistenz beruhendem D. m. ein irreversibler Insulinmangeldiabetes wird (FELDMAN & NELSON, 2004; NORMAN et al., 2006).

#### **1.6.2.1. Akute und chronische Pankreatitis**

Häufige Krankheiten, die zur Zerstörung der endokrinen Zellen des Pankreas und damit zum Fehlen der Insulinsekretion führen sind akute oder chronische Pankreatitiden, selten kommen Neoplasien des exokrinen Pankreas vor (ALEJANDRO et al., 1988). Eine akute Pankreatitis führt dabei eher zur raschen Zerstörung der  $\beta$ -Zellen und damit zu einer fehlenden Insulinsekretion, wohingegen die chronische Pankreatitis als wichtigster Grund für eine entzündungsbedingte Insulinresistenz gilt (FELDMAN & NELSON, 2004).

#### **1.6.2.2. Hyperadrenokortizismus**

Glukokortikoide, entweder durch körpereigene Produktion entstanden oder iatrogen zugeführt, führen durch vermehrte Glykogenolyse und Glukoneogenese zur Erhöhung des Blutzuckerspiegels. Sie wirken so als Insulinantagonist und können damit zum D. m. führen. Weiterhin führen Glukokortikoide zu einer

peripheren Insulinresistenz, d. h. sie vermindern die Affinität der Insulinrezeptoren zu ihren Liganden (FLIER, 1983; SELMAN et al., 1997). Häufig löst eine Nebennierenrindenüberfunktion, beim Hund als Morbus Cushing bezeichnet, durch die exzessive Kortisolproduktion einen sekundären D. m. aus. In einer Studie konnte bei 23 % aller Hunde mit D. m. eine Überfunktion der Nebennierenrinde diagnostiziert werden, und jeder Patient, dessen klinische Symptome nicht auf Insulingabe ansprechen, sollte auf Hyperadrenokortizismus getestet und gegebenenfalls behandelt werden (HESS et al., 2000).

#### **1.6.2.3. Progesteronüberschuss**

Durch Insulinresistenz kommt es beim Gestationsdiabetes der Hündin zu einem erhöhten Insulinbedarf und damit zu einem Insulinmangel in der Peripherie. In der Milchdrüse der Hündin wird im Diöstrus unter Progesteroneinfluss das diabetogene Wachstumshormon GH gebildet, sowohl während der tatsächlichen Trächtigkeit als auch während einer Pseudogravidität. Wie genau GH zu einer Insulinresistenz führt, ist bisher nicht geklärt, die Affinität der Insulinrezeptoren zu ihrem Liganden ist nicht vermindert (FLIER, 1983). Es wird vermutet, dass GH die Signaltransduktion des Insulinrezeptors verändert, auch führt ein länger anhaltender GH-Überschuss zu einer Verminderung der Zahl der Insulinrezeptoren (DOMINICI & TURYN, 2002). Auch das Progesteron selbst und gestagenhaltige Medikamente, zum Beispiel zur Läufigkeitsunterdrückung, können über bisher unbekannte Mechanismen eine diabetogene Wirkung ausüben (SELMAN et al., 1994; LIVINGSTONE & COLLISON, 2002; NORMAN et al., 2006).

#### **1.6.2.4. Entzündungen und Neoplasien**

Genau wie jede Entzündung im Körper ein Grund für eine Insulinresistenz sein kann, kann auch jede Art von Neoplasie eine Insulinresistenz durch Sekretion von insulinantagonistischen Hormonen bedingen (SHOELSON et al., 2006). Da Hunde mit D. m. im Schnitt älter sind als die Gesamtpopulation aller Tiere, ist auch das Auftreten von Tumorerkrankungen wahrscheinlicher (HESS et al., 2000).

#### **1.6.3. Begleitkrankheiten und Spätfolgen**

Die am häufigsten gleichzeitig mit D. m. auftretenden Krankheiten sind Hyperadrenokortizismus, akute oder chronische Pankreatitis, Harnwegsinfektionen, Infektionen der Haut und der Ohren, sowie Katarakte. Seltener wurden Neoplasien und Hypothyreose sowie diabetische Nephropathien

festgestellt (HESS et al., 2000). Es müssen jedoch die oben bereits genannten, möglicherweise ursächlichen Krankheiten wie Hyperadrenokortizismus und Pankreatitis, die D. m. auslösen können, von den Folgen des D. m., wie zum Beispiel der Infektionsneigung des Harntraktes und eventuell der Haut sowie der Katarakt abgegrenzt werden.

#### **1.6.3.1.Pankreatitis**

Chronische und akute Entzündungen der Bauchspeicheldrüse nehmen eine Zwischenstellung ein, da sie sowohl durch D. m. verursacht sein können als auch durch Entzündungsprodukte und freiwerdende Fermente des exokrinen Pankreas eine Zerstörung der  $\beta$ -Zellen und damit einen D. m. auslösen können (HESS et al., 1999). Warum D. m. für Pankreatitiden prädisponiert, ist unklar, ein Mechanismus könnte die Hyperlipidämie sein, die beim Menschen als Risikofaktor für akute Pankreatitis gilt (TOSKES, 1990).

#### **1.6.3.2.Harnwegsinfektionen**

Bakterielle Infektionen der Harnwege, meistens des unteren Harntraktes, kommen sehr häufig bei Hunden mit D. m. vor. Eine Studie ergab, dass 21 % der von Hunden mit D. m. genommenen Urinkulturen Bakterienwachstum zeigten, mit *Escherichia coli* als häufigstem Keim (HESS et al., 2000). Zwei Mechanismen führen zu einer erhöhten Anfälligkeit für Harnwegsinfektionen: Zum einen bietet der Urin von Hunden mit D. m. durch den hohen Glukosegehalt gute Lebensbedingungen für Bakterien, zum anderen zeigen Leukozyten von Hunden mit schlecht kontrolliertem D. m. verminderte Adhärenz an Endothelien und gelangen damit schlechter an den Infektionsort als bei gesunden Hunden (LATIMER & MAHAFFEY, 1984). Beim Menschen mit schlecht kontrolliertem D. m. konnten auch verminderte intrazelluläre Aktivität der Leukozyten gegen Bakterien sowie verminderte Chemotaxis und Fähigkeit zur Phagozytose nachgewiesen werden (BAGDADE et al., 1974).

Auch bakterielle Infektionen der Harnwege können eine Insulinresistenz bedingen. Eine bakteriologische Untersuchung des Urins sollte daher regelmäßig im Rahmen der Therapiekontrollen durchgeführt werden.

#### **1.6.3.3.Infektionen der Haut und der Ohren**

Mindestens 30 % der Menschen mit D. m. entwickeln Hautkrankheiten (PEREZ & KOHN, 1994). In retrospektiven Studien an Hunden wurde über eine Häufung von Hautkrankheiten, vor allem bakteriellen Haut- und Ohrinfektionen sowie Hautpilze und unspezifische Manifestationen wie Seborrhoe und Alopezie

berichtet (DIEHL, 1995; HESS et al., 2000). Eine neuere Studie stellte jedoch keinen besonderen Zusammenhang zwischen Hauterkrankungen beim Hund und D. m. her, sondern führte die früher festgestellten Erkrankungen auf bereits bestehende, andere Grunderkrankungen wie beispielsweise Allergien, Hyperadrenokortizismus oder Behandlung mit Glukokortikoiden zurück (PEIKES et al., 2001).

#### **1.6.3.4.Katarakt**

Trübungen der Augenlinse, als Katarakt bezeichnet, sind eine der häufigsten Begleiterkrankungen des caninen D. m.. Ein halbes Jahr nach Diagnosestellung entwickeln die Hälfte aller Hunde eine Katarakt, ein Jahr nach Diagnosestellung sind es bereits 75 % (BEAM et al., 1999).

Der Anstieg der Blutglukosekonzentration führt zu einer vermehrten Diffusion von Glukose in die Linse und zur Sättigung des normalen Abbauweges, der Glukose anaerob zu Laktat verstoffwechselt. Die überschüssige Glukose wird dann über den Sorbitol-Abbauweg mit Hilfe der Aldose-Reduktase und der Sorbitol-Dehydrogenase über Sorbitol zu Fruktose metabolisiert. Da Sorbitol und Fruktose die Linsenkapsel im Gegensatz zu Glukose nicht frei passieren können, reichern sie sich in der Linse an und wirken hydrophil. Nachfolgend strömt Wasser in die Linse ein, die Linsenfasern schwellen an und können reißen. Dies führt zu einer Trübung der Linse und zur Blindheit (FELDMAN & NELSON, 2004; WILKIE et al., 2006).

Durch operative Entfernung der getrübbten Linse mittels Phacoemulsifikation mit oder ohne Einsetzen eines intraokularen Linsenimplatates kann meist die Sehfähigkeit wieder hergestellt werden. Es sollte jedoch die Erhaltung der Retinafunktion mittels Elektroretinographie präoperativ überprüft werden (WILKIE et al., 2006).

#### **1.6.3.5.Diabetische Nephropathie**

Bei 30 - 40 % aller humanen D.-m.-Patienten entwickelt sich eine diabetische Nephropathie. Sie ist damit der häufigste Grund für terminales Nierenversagen und Dialysebedürftigkeit in der Humanmedizin (STRIPPOLI et al., 2003). Die Ätiologie ist multifaktoriell und noch nicht im Detail aufgeklärt. Eine genetische Prädisposition scheint zu bestehen. Sowohl die Hyperglykämie selbst als auch durch diese ausgelöste Veränderungen der Hämodynamik führen zur Nierenschädigung. Durch Aktivierung der Proteinkinase C und erhöhte Produktion von AGEs, sowie durch glomeruläre Hyperfiltration und

Mikroalbuminurie kommt es zur vermehrten Produktion von Transforming Growth Faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Dieser Wachstumsfaktor ist verantwortlich für eine verstärkte extrazelluläre Ablagerung von Matrixproteinen im Glomerulum; damit kommt es zu einer Verdickung der Basalmembran und zur Expansion des Mesangiums (SCHENA & GESUALDO, 2005). Da die Dauer der initialen Phase circa fünf Jahre beträgt und die diabetische Nephropathie erst nach circa 20 Jahren voll ausgeprägt ist, tritt sie aufgrund der kürzeren Lebensspanne der Haushunde nur sehr selten auf (STRIPPOLI et al., 2003; FELDMAN & NELSON, 2004).

#### **1.6.3.6.Diabetische Ketoazidose**

Die DKA ist die lebensbedrohliche Entgleisung des Körperstoffwechsels aufgrund eines unbehandelten oder schlecht eingestellten D. m., charakterisiert durch die biochemische Trias aus Hyperglykämie, Azidose und Ketose. Wie bereits beschrieben, führt ein Insulin- und Glukosemangel in den peripheren Körperzellen zu verstärkter Lipolyse und zur Bildung von Ketonkörpern in der Leber, da die anfallenden freien Fettsäuren zu Acetyl-CoA oxidiert werden, welches aufgrund des Glukosemangels in der Zelle jedoch nicht dem Citratzyklus zugeführt werden kann und zu den schwachen Säuren Azeton, Azetoazetat und  $\beta$ -Hydroxybutyrat verstoffwechselt wird. Durch erhöhte Konzentrationen an insulinantagonistischen Hormonen (vor allem Glukagon und Glukokortikoiden) wird dieser Effekt noch verstärkt und es kommt durch verstärkte Glukoneogenese und Glykogenolyse zu einer weiteren Erhöhung des Blutzuckerspiegels. Dies führt zur osmotischen Diurese, Elektrolytverlust und zur Dehydratation (SONKSEN & SONKSEN, 2000; GOODMAN, 2003).

Ketonkörper können von vielen Körperzellen, unter anderem im Gehirn, zwar zur Energiegewinnung herangezogen werden, werden sie aber im Überschuss gebildet tragen sie zur schweren Entgleisung des Körperstoffwechsels bei. Sie wirken als schwache Säuren und führen deswegen zur Erschöpfung der Puffersysteme im Blut und damit zur metabolischen Azidose. Sie werden frei durch das Glomerulum filtriert und verstärken durch ihre Hydrophilie die osmotische Diurese. Durch die negative Ladung der Ketonkörper werden Kationen wie Natrium und Kalium, aber auch Kalzium und Magnesium aus dem Blut in den Urin sezerniert, um die Elektroneutralität des Blutes aufrecht zu erhalten. Damit kommt es zu einer Verarmung des Körpers an Natrium und Kalium und zu einer weiteren, starken Austrocknung. Bei fehlendem Glukoseeinstrom in die Körperzellen kann kein Kalium in die Zelle gelangen, da dies mit Hilfe eines

Glukosetransporters geschieht. Die Blutazidose führt zu einer Verlagerung des intrazellulären Kaliums ins Gefäßsystem im Austausch mit Wasserstoffionen, und dadurch zu einer weiteren Verarmung der Kaliumspeicher im Gewebe.

Im Vordergrund der Pathogenese der DKA stehen die von den Ketonkörpern verursachte, teils schwere metabolische Azidose sowie Elektrolytverluste und eine hochgradige zelluläre Dehydratation. Die Azidose und der Elektrolytverlust können durch Reizung der Chemorezeptortriggerzone zu Übelkeit und Erbrechen führen und so die Dehydratation weiter verstärken. Die Dehydratation kann durch periphere Minderdurchblutung zu Laktatbildung im Gewebe führen, welche die Azidose noch weiter verstärken kann. Unmittelbare Folgen der Dehydratation sind ein Absinken der glomerulären Filtrationsrate und eine prärenale Azotämie. Dies vermindert die Exkretion von Glukose und Ketonkörpern in den Urin und führt zu einem weiteren Anstieg der Plasmaosmolalität. Dadurch strömt Wasser aus den Zellen in die Blutgefäße, durch diese zelluläre Dehydratation kommt es zu Bewusstseinsstörungen bis hin zum diabetischen Koma. Klinische Zeichen einer DKA beim Hund sind, neben den Symptomen eines D. m., Verschlechterung des Allgemeinbefindens und des Bewusstseinsreduktion bis hin zum Koma, Anorexie, Erbrechen und Dehydratation (MACINTYRE, 1995).

Die Diagnose wird aufgrund der klinischen Symptome in Verbindung mit der Diagnose eines D. m. und der Dokumentation von Ketonkörpern in Urin oder Serum gestellt. Da häufig eine durch Begleitkrankheiten (Pankreatitis, Infektionen, Hyperadrenokortizismus) ausgelöste Insulinresistenz für das Entstehen einer DKA verantwortlich ist, müssen eventuell weitergehende diagnostische Maßnahmen ergriffen werden. Das Hauptaugenmerk bei der Behandlung muss, neben der adäquaten Blutzuckerkontrolle durch schnellwirksames Insulin, auf dem Ausgleich der Azidose, des Flüssigkeitsdefizites und der Elektrolytimbalancen liegen. Hierzu ist eine ständige Überwachung des Blutzuckerspiegels, des Säure-Basen-Haushaltes und der Elektrolytkonzentrationen im Blut und ggf. häufige Therapieanpassung nötig. Die Mortalität der DKA liegt trotz Intensivbehandlung beim Hund bei circa 30 % , unbehandelt endet sie immer tödlich (FELDMAN & NELSON, 2004; NELSON, 2005; HUME et al., 2006).

### **1.7. Behandlung des caninen Diabetes mellitus**

Diabetische Hunde sind fast immer auf exogene Zuführung von Insulin angewiesen, um Hyperglykämie und diabetische Ketoazidose zu vermeiden

(DAMINET, 2003). Auch im Falle einer transienten Insulinresistenz kommt es normalerweise sekundär zu einer irreversiblen Erschöpfung der Sekretionskapazität der  $\beta$ -Zellen, so dass auch hier eine lebenslange exogene Insulinzufuhr vonnöten ist. Orale Antidiabetika sind beim Hund aus diesen Gründen nicht wirksam, da keine ausreichende Rest-Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen mehr besteht. Die Therapie des caninen D. m. besteht aus Insulintherapie und begleitender Fütterungsumstellung (FELDMAN & NELSON, 2004; HESS, 2006).

### **1.7.1. Insulinarten**

Die auf dem Markt befindlichen Insulinarten zur subkutanen Injektion unterscheiden sich durch ihre Herkunft (Schwein, Rind, gentechnische Herstellung) und ihre Wirkung (Einsetzen der Wirkung nach subkutaner Injektion, Dauer, Intensität). Je kürzer die Wirkdauer, desto stärker ist die initiale Insulinwirkung. Die am häufigsten verwendeten Insulin-Arten sind Isophan-Insulin (NPH), Lente- und Ultralente-Insulin sowie Protamin-Zink-Insulin (PZI). NPH und PZI enthalten das Fischprotein Protamin und Zink, um die Absorption des Insulins zu verzögern und somit die Insulinwirkung zu verlängern. Die Lente- und Ultralente-Insuline enthalten kein Fremdprotein, sondern erreichen die langsamere Resorption im Körper durch Bildung von Kristallen unterschiedlicher Größe und durch unterschiedlichen Zink-Gehalt. Glargine ist ein rekombinant hergestelltes ultra-langwirksames Insulin, dessen langsamere Absorption auf einer Änderung in der Aminosäuresequenz und damit einen Anstieg des isoelektrischen Punktes und somit einer schlechteren Löslichkeit im subkutanen Gewebe beruht (FELDMAN & NELSON, 2004).

Beim Hund wird meist mit einer subkutanen Injektion eines mittellang wirksamen (Lente-)Insulins begonnen, das aus Schweine-Pankreata gewonnen wird. Lente-Insulin besteht zu 30 % aus kurzwirksamem Insulin und zu 70 % aus langwirksamem, mikrokristallinen Insulin (MONROE et al., 2005). Da Caninsulin<sup>®</sup> (Fa. Intervet, Unterschleissheim, Deutschland) momentan das einzige auf dem deutschen Markt für Hunde zugelassene Insulin-Präparat ist ([www.vetidata.de](http://www.vetidata.de)), muss aus arzneimittelrechtlichen Gründen die initiale Behandlung mit diesem Medikament erfolgen. Wenn jedoch die Behandlung mit Caninsulin<sup>®</sup> nicht erfolgreich ist, und somit Indikation für ein länger wirksames oder anders strukturiertes Insulin gegeben ist, darf dieses verabreicht werden.



### **1.7.2. Beginn der Insulintherapie**

Der Nüchternblutzuckerspiegel wird gemessen. Dann werden nach der Fütterung 0,25 Internationale Einheiten (International Units, IU)/kg Körpergewicht (KG) Caninsulin® subkutan injiziert. Nach vier bis sechs Stunden, dem vermuteten Nadir (dem Zeitpunkt des niedrigsten Blutglukosespiegels), wird erneut der Blutglukosespiegel gemessen. Falls die Blutglukosekonzentration unter 4,5 mmol/l liegt, muss die Insulindosis reduziert werden. Falls nicht, wird nach zwölf Stunden, nach erneuter Blutglukosemessung die gleiche Insulindosis appliziert. Normalerweise kann der Patient nach 24 Stunden wieder aus der Klinik entlassen werden, so lange keine DKA vorliegt, die einen längeren stationären Aufenthalt und intensive Therapie erfordert. Da der Körper einige Tage braucht, um sich an die Insulinapplikation anzupassen, erfolgt die genaue Dosiseinstellung erst im Laufe der folgenden Wochen. Der Besitzer muss darüber informiert werden, dass erst nach ca. vier bis sechs Wochen mit einer vorläufigen stabilen Einstellung der Insulindosis seines Hundes zu rechnen ist und dass sowohl die Insulindosierung, als auch der Typ des verwendeten Insulins und die Häufigkeit der Applikation sich während dieser Zeit noch ändern können. Der erste Kontrolltermin sollte nach einer Woche nach Therapiebeginn erfolgen (BENNETT, 2002).

Der Kontrolltermin sollte zum Zeitpunkt der morgendlichen Insulininjektion stattfinden. Neben einer kompletten klinischen Untersuchung und der Erhebung des Körpergewichts des Hundes wird der Besitzer nach seiner Einschätzung der Trink- und Urinmenge und des Allgemeinbefindens seines Hundes sowie der Praktikabilität der täglichen Injektionen befragt. Nachdem dann der Nüchternblutzuckerwert gemessen wurde, sollte nach der Fütterung der Besitzer selbst die Insulininjektion zur gewohnten Uhrzeit unter Aufsicht des Tierarztes vornehmen, um eventuelle Applikationsfehler erkennen und beheben zu können. Danach wird das Tier stationär aufgenommen und zum ersten Mal ein Zwölfstunden-Blutzuckertagesprofil angefertigt, indem alle zwei Stunden der Blutglukosespiegel gemessen wird (BENNETT, 2002; FELDMAN & NELSON, 2004; NELSON, 2005).

### **1.7.3. Kontrolle des Behandlungserfolgs**

Da jeder Patient anders auf die gleiche Insulindosis reagiert und unterschiedliche Stoffwechsellagen beim gleichen Patienten Anpassungen der Insulindosis notwendig machen, sind häufige Kontrollen zur zufriedenstellenden Einstellung eines diabetischen Patienten notwendig. Hierzu werden als diagnostische

Kriterien neben der klinischen Besserung Blutzuckertagesprofile und der Fruktosaminwert heran gezogen.

### **1.7.3.1. Beurteilung eines Blutzuckertagesprofils**

Idealerweise sollten alle Werte eines Blutzuckertagesprofils zwischen 5,5 und 14 mmol/l liegen. Beurteilt werden weiterhin die Insulinwirksamkeit sowie die Dauer der Insulinwirkung und der tiefste Wert des Blutzuckertagesprofils (Nadir).

Um die Insulinwirkung beurteilen zu können, muss sowohl die Differenz zwischen höchstem und tiefsten Blutzuckerwert als auch der Absolutwert der höchsten Blutzuckerkonzentration sowie die Insulindosis heran gezogen werden; beispielsweise ist eine Differenz im Blutzuckerspiegel von 3 mmol/l durchaus akzeptabel, wenn der höchste Wert bei 9,5 mmol/l und der niedrigste bei 6,5 mmol/l liegt; die gleiche Differenz zwischen den Werten 22,5 mmol/l und 19,5 mmol/l spricht jedoch für eine Insulinresistenz. Auch die Insulindosis muss mit in Betracht gezogen werden, bei einer geringen Dosis (beispielsweise 0,5 IU/kg KG) spricht eine Differenz von 5,5 mmol/l zwischen der höchsten und der niedrigsten Blutglukosekonzentration für ein gutes Ansprechen auf Insulin, bei einer Dosierung von über 2 IU/kg KG jedoch für eine Insulinresistenz.

Die Dauer der Insulinwirkung kann nur beurteilt werden, wenn der Nadir über 4,5 mmol/l liegt und kein zu schneller Abfall der Blutglukosekonzentration nach Insulinapplikation vorliegt, da in diesem Fall die Insulindosis zu hoch ist und eine Gegenregulation des Körpers einsetzt. Die Dauer der Insulinwirkung wird als die Zeit beurteilt, die von der Injektion über den Nadir bis zu dem Zeitpunkt vergeht, an der die Blutglukosekonzentration über ca. 11 – 14 mmol/l steigt. Die Insulinwirkung sollte zwischen zehn und 14 Stunden andauern. Im Falle einer kürzeren Wirkdauer ist die Kontrolle der Hyperglykämie nicht ideal, im Falle einer längeren Wirkdauer besteht die Gefahr einer Hypoglykämie, wenn nach zwölf Stunden die erneute Insulininjektion erfolgt. Fast immer ist auch mit lang- und ultralangwirksamen Insulinen eine Injektion zweimal am Tag nötig.

Der tiefste Wert der Blutglukosekonzentration sollte idealerweise zwischen 5,5 und 7 mmol/l liegen. Bei Werten unter 4,5 mmol/l oder über 8,5 mmol/l sollte die Insulindosis angepasst werden. Die Dosis sollte in kleinen Schritten, d. h. um 10 - 25 % pro Kontrolluntersuchung geändert werden, und dann eine erneute Beurteilung nach einer Woche erfolgen. Erhält der Hund eine hohe Insulindosis (> 2,2 IU/kg KG) und sind die Blutzuckerkonzentrationen trotzdem zu hoch, sollte nach Gründen für eine Insulinresistenz gesucht werden oder eine Gegenregulation

des Körpers zur Vermeidung einer Hypoglykämie (Somogyi-Effekt) in Betracht gezogen werden (BENNETT, 2002; FELDMAN & NELSON, 2004).

#### **1.7.3.2.Somogyi-Effekt**

Wenn der Blutzuckerspiegel unter 3,5 mmol/l sinkt oder die Insulingabe eine Absinken des Blutzuckerspiegels um mehr als 5,5 mmol/l pro Stunde bewirkt, beginnt der Körper eine massive Gegenregulation durch die Ausschüttung von diabetogenen Hormonen, hauptsächlich Adrenalin und Glukagon, und steigert den Blutzuckerspiegel durch hepatische Glykogenolyse und Glukoneogenese. Diese Gegenregulation kann zu einem extremen Anstieg des Blutzuckerspiegels (bis auf 45 mmol/l) innerhalb von zwölf Stunden und einer 48 - 72 Stunden andauernden Insulinresistenz führen und wird Somogyi-Effekt oder Somogyi-Overswing genannt (GERICH, 1988).

Die Zeichen der initialen Hypoglykämie werden dabei oftmals übersehen, so dass die klinischen Symptome und labordiagnostischen Veränderungen denen eines schlecht kontrollierten Diabetes durch Insulinunterdosierung gleichen (hohe Blutzuckerwerte, Polydipsie, Polyurie). Die morgendlichen Nüchternblutzuckerwerte liegen dabei oftmals über 17 mmol/l, so dass, wenn nur isolierte Blutzuckerwerte zur Kontrolle der Diabetes-Einstellung heran gezogen werden, der Tierarzt zu der Annahme verleitet werden kann, es liege eine Insulinunterdosierung vor und daher fälschlicherweise die Insulindosis erhöht statt verringert.

Das Vorliegen eines Somogyi-Overswings sollte immer in Betracht gezogen werden, wenn ein schlecht kontrollierter D. m. vorliegt, besonders jedoch bei kleinen Rassen oder wenn die Insulindosis 2,2 IU/kg KG übersteigt. Die Behandlung erfolgt durch Reduzierung der Insulindosis um 10 - 25 %, wenn diese unter 1 IU/kg KG liegt. Liegt sie darüber, wird erneut mit der Gabe der Initialdosis von 0,25 IU/kg KG zweimal täglich begonnen und eine Kontrolluntersuchung mit Blutzuckertagesprofil in ein bis zwei Wochen angeschlossen (FELDMAN & NELSON, 2004).

#### **1.7.3.3.Fruktosamin als Parameter für die Kontrolle der Hyperglykämie**

Fruktosamin entsteht durch die irreversible Glykierung von Albumin durch die Blutglukose und kann somit als „Langzeitblutzuckerwert“, der die Blutglukosekonzentration der letzten ein bis drei Wochen (die Lebensdauer des Serum-Albumins) repräsentiert, heran gezogen werden (LOSTE & MARCA, 2001). Bei einer deutlichen Hypalbuminämie (< 25 g/dl) kann der

Fruktosaminwert falsch niedrig sein, da weniger Serumprotein vorhanden ist, das glykiert werden kann. Ebenso kann der Fruktosaminwert bei Hyperlipidämie und Azotämie falsch niedrig sein, der Grund hierfür ist jedoch unbekannt (REUSCH & HABERER, 2001). Der in der Humanmedizin verwendete Langzeitparameter, Hb<sub>a1c</sub>, misst den Anteil des durch die Blutglukose glykierten Hämoglobins im Blut und gibt somit ebenfalls Aufschluss über den Langzeitblutzuckerwert. Er kann auch zur Beurteilung der Diabetes-Kontrolle beim Hund dienen und repräsentiert den Blutzuckerspiegel der letzten 110 Tage. Dies ist die Lebensspanne der caninen Erythrozyten, in denen das glykierte Hämoglobin gespeichert ist (ELLIOTT et al., 1997).

Aus Gründen der besseren Validierung und der Verfügbarkeit in veterinärmedizinischen Labors wird jedoch meist der Fruktosaminwert zur Beurteilung der Einstellung des D. m. heran gezogen (siehe Tab. 1). Ein Fruktosamin-Wert zwischen 350 und 450 µmol/l lässt bei den meisten Hunden auf gute Kontrolle des Diabetes schließen (BENNETT, 2002).

Tab. 1 Fruktosaminwerte bei Hunden mit Diabetes mellitus

|                                      |                  |
|--------------------------------------|------------------|
| Referenzbereich bei gesunden Hunden: | 225 - 365 µmol/l |
| Exzellent kontrollierter Diabetes:   | 350 - 400 µmol/l |
| Gut kontrollierter Diabetes:         | 400 - 450 µmol/l |
| Akzeptabel kontrollierter Diabetes:  | 450 - 500 µmol/l |
| Schlecht kontrollierter Diabetes:    | > 500 µmmol/l    |
| Hinweis auf andauernde Hypoglykämie: | < 300 µmmol/l    |

#### 1.7.4. Langzeitmanagement des diabetischen Patienten

Die Einstellung des diabetischen Patienten sollte nicht nur auf der Basis der Laborwerte (Blutzuckertagesprofile, Fruktosaminwert, Glukosurie) sondern vor allem auch anhand der klinischen Symptome erfolgen. D. h. das Ziel der Therapie ist hauptsächlich die Abwesenheit von klinischen Symptomen des D. m. (Polydipsie, Polyurie, Gewichtsverlust) und begleitenden Erkrankungen (Harnwegsinfektionen, Katarakt), aber auch die Vermeidung einer Hypoglykämie. Die Herstellung einer Euglykämie ist nicht das vorrangige Ziel der Einstellung des diabetischen Hundes. Da die in der Humanmedizin gefürchteten Komplikationen des D. m., wie beispielsweise diabetische Nephropathie oder die diabetische Angiopathie Jahrzehnte zur Ausprägung brauchen, kommen sie beim

Hund so gut wie nicht vor; daher liegt das Gewicht in der Therapie des caninen D. m. auch mehr auf der Verhinderung einer Hypoglykämie (die innerhalb von wenigen Stunden zum Tode führen kann) und nicht so sehr auf einer strengen Vermeidung eines zeitweilig zu hohen Blutzuckerspiegels.

Nachdem eine adäquate Kontrolle des Blutzuckerspiegels etabliert wurde, sollten Nachkontrollen alle drei bis sechs Monate durchgeführt werden (BENNETT, 2002). Dabei sollte der behandelnde Tierarzt jeweils anhand des Fruktosaminwerts, der Urinuntersuchung zum Nachweis einer eventuell vorhandenen Glukosurie und Ketonurie, des klinischen Gesamteindrucks, des Körpergewichts sowie der Einschätzung des Allgemeinbefindens und der Trink- und Urinmenge des Hundes durch den Besitzer abschätzen, ob die momentane Insulindosis eine ausreichende Kontrolle des Blutzuckerspiegels gewährleistet oder ob die Dosis angepasst werden muss. Alle sechs bis zwölf Monate, je nach klinischem Zustand des Patienten, sollte auch eine bakteriologische Untersuchung des Urins durchgeführt werden (FELDMAN & NELSON, 2004; NELSON, 2005).

#### **1.7.5. Fütterung des diabetischen Patienten**

Idealerweise sollten Hunde mit D. m. ihren Kalorienbedarf auf zwei Mahlzeiten täglich aufgeteilt verabreicht bekommen, um den Zeitpunkt der stärksten Insulinwirkung so nahe wie möglich mit dem Zeitpunkt der postprandialen Hyperglykämie in Übereinstimmung zu bringen (NELSON, 2005). Um eine insulininduzierte Hypoglykämie zu verhindern, sollte das Insulin erst nach erfolgter Nahrungsaufnahme injiziert werden. Sollte der Hund die Nahrungsaufnahme verweigern oder nur wenig fressen, darf dann nur die Hälfte der üblichen Insulindosis appliziert werden, um eine Hypoglykämie zu vermeiden. Zwischen den Mahlzeiten sollte keine weitere Nahrung aufgenommen werden, in manchen Fällen kann jedoch eine zusätzliche Fütterung zum Zeitpunkt des Nadirs zur Verhinderung einer Hypoglykämie beitragen. Als günstig für die Kontrolle des Blutzuckerspiegels haben sich Futter mit einem geringen Fettgehalt, mäßigem Proteingehalt und hohem Fasergehalt sowie vor allem einem niedrigen Gehalt an einfachen, leicht verstoffwechselbaren Zuckern erwiesen (GRAHAM et al., 2002). Feuchtfutter führt zu einem rascheren postprandialen Anstieg des Blutzuckerspiegels als Trockenfutter und ist daher weniger gut zur Fütterung des Hundes mit D. m. geeignet (HOLSTE et al., 1989).

Der Kalorienbedarf richtet sich nach dem Ernährungszustand des Hundes, adipöse Tiere sollten zur Verbesserung der Insulinwirkung langsam ihr Gewicht reduzieren; Tiere in schlechtem Ernährungszustand können bei Verabreichung eines Futters mit mäßigem bis hohem Faseranteil Probleme mit der Aufrechterhaltung des Körpergewichts bekommen. In solchen Fällen sollte entweder die Futtermenge oder der Fettgehalt des Futters erhöht werden (ZICKER et al., 2000).

### **1.8. Ätiologie des Diabetes mellitus**

Um die Unterschiede und Gemeinsamkeiten des caninen und humanen D. m. darstellen zu können, soll die Klassifikation des humanen D. m. im folgenden kurz beschrieben werden. Die Klassifikation des caninen D. m. wird mit Bezug auf die entsprechende Einteilung in der Humanmedizin vorgenommen.

#### **1.8.1. Ätiologische Einteilung beim Menschen**

Die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) erstellte bereits 1965 Kriterien zur Klassifikation des D. m. beim Menschen. Diese wurden 1997 von der amerikanischen Diabetes-Gesellschaft (American Diabetes Association, ADA) überarbeitet. Die WHO und die deutsche Diabetes-Gesellschaft (DDG) übernahmen diese neuen Kriterien im Jahr 2000. In diesen Leitlinien wird die alte Klassifikation entsprechend der Insulinbedürftigkeit des Patienten in insulinabhängigen D. m. (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) und insulinunabhängigen D. m. (non-insulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM) verworfen und statt dessen eine ätiologische Einteilung der Formen des D. m. empfohlen (ALBERTI & ZIMMET, 1998).

##### **1.8.1.1. Typ I Diabetes mellitus**

Der humane Typ I D. m. hat eine progrediente, irreversible Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen als Ursache. Er führt unbehandelt zur ketoazidotischen Stoffwechselentgleisung und damit zum Tod. Er tritt zumeist in jugendlichem Alter auf, kann aber auch als sogenannter „latent autoimmune diabetes in adults“ (LADA) erst im Erwachsenenalter auftreten, oft in milderer Form (HOSSZUFALUSI et al., 2003). Beim LADA ist die anfängliche Gefahr einer DKA geringer, da zum Zeitpunkt der Diagnose häufig noch eine Restinsulinsekretion besteht. Der Typ I D. m. wird in zwei Gruppen eingeteilt: Typ I a, verursacht durch eine autoimmune Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas, und Typ I b, der sehr selten ist, mit hoher Penetranz vererbt wird und als

idiopathisch bezeichnet wird, da seine Ätiologie völlig ungeklärt ist (IMAGAWA et al., 2000).

Die Diagnose eines Typ I a D. m. wird durch den Nachweis von Autoantikörpern gegen  $\beta$ -Zellen (Islet Cell Antigen, ICA), gegen körpereigenes Insulin (Insulin Autoantibodies, IAA) und gegen die Inselzellantigene Glutamat-Dekarboxylase (GAD65A) und Tyrosin-Phosphatase (IA-2A oder ICA512A) gestellt. Neben der erblichen Prädisposition spielen auch Umweltfaktoren eine Rolle in der Pathogenese des D. m. Typ I a. Da der Typ I b sehr selten ist und in der Forschung im Vergleich zum Typ I a eine sehr kleine Rolle spielt, soll im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Typ I a als Typ I D. m. (T1DM) bezeichnet werden. Für Typ I Diabetiker ist die exogene Zuführung von Insulin nahezu immer lebenswichtig (KERNER et al., 2001).

#### **1.8.1.2. Typ II Diabetes mellitus**

Beim Typ II D. m. besteht kommt es nicht zu einer autoimmunen Zerstörung der  $\beta$ -Zellen. Seine phänotypischen Ausprägungen reichen von einer überwiegenden Insulinresistenz bis hin zu schweren Störungen der Insulinsekretion, oft sind beide Phänomene vergesellschaftet. Der Typ II D. m. tritt meist bei älteren, übergewichtigen Patienten auf und ist häufig durch eine Kombination von Gewichtsabnahme, Ernährungsumstellung und oralen Antidiabetika gut zu behandeln (BLOOMGARDEN, 2006). Oftmals ist nur im Endstadium eine exogene Insulinzufuhr vonnöten. Die Neigung zur DKA ist geringer als beim T1DM, die mikrovaskulären Langzeitkomplikationen wie zum Beispiel diabetische Retinopathie oder diabetische Nephropathie treten jedoch ebenfalls sehr häufig auf. Es besteht ebenfalls eine genetische Prädisposition (NEWMAN et al., 1987).

#### **1.8.1.3. Andere Formen des Diabetes mellitus**

Als Gestationsdiabetes wird das Neuauftreten von D. m. während der Schwangerschaft aufgrund der progesteroninduzierten Insulinresistenz bezeichnet. Er ist die häufigste Stoffwechselstörung bei Schwangeren, hat einen heterogenen genetischen Hintergrund und variiert im Schweregrad (HOLLANDER et al., 2007).

Andere Formen des Diabetes sind sehr selten und werden aufgrund ihrer Ätiologie verschiedenen Gruppen zugeordnet. Der früher als „maturity onset diabetes of the young (MODY)“ bezeichnete genetische Defekt der  $\beta$ -Zellen wird nun nach dem Chromosom benannt, welches das jeweils defekte Gen trägt (beispielsweise

Chromosom 20 HNF-4 $\alpha$  für den früheren MODY 1). Genetische Defekte der Insulinwirkung bilden genauso wie durch andere Endokrinopathien (z. B. Akromegalie oder Hyperthyreose) verursachter D. m., Erkrankungen des exokrinen Pankreas oder medikamenteninduzierter D. m. eine eigene Gruppe von Diabetes-Typen (KERNER et al., 2001).

### **1.8.2. Ätiologische Einteilung beim Hund**

Die früher in der Tiermedizin angewandte Einteilung des D. m. in insulinabhängigen (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) und insulinunabhängigen (non-insulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM) bringt zwei Nachteile mit sich: Zum einen sind fast alle Hunde dauerhaft auf die Therapie mit Insulin angewiesen, und leiden damit per definitionem an einem IDDM, zum anderen wird bei dieser Einteilung keine Rücksicht auf die völlig unterschiedliche Ätiologie beispielsweise eines durch periphere Insulinresistenz verursachten D. m. im Vergleich zur einem aufgrund von Zerstörung der  $\beta$ -Zellen verursachten D. m. genommen. Praktikabler und aufschlussreicher im Hinblick auf die ätiologische Einteilung ist die Klassifikation des Royal Veterinary College (CATCHPOLE et al., 2005), die den caninen D. m. in zwei Gruppen einteilt: Diabetes, verursacht durch absolute Insulindefizienz (insulin deficiency diabetes, IDD) und Diabetes, verursacht durch periphere Insulinresistenz (insulin resistency diabetes, IRD). Es muss jedoch beachtet werden, dass eine länger andauernde Hyperglykämie beim Hund auch zur Zerstörung der  $\beta$ -Zellen führt (IMAMURA et al., 1988), und damit ein IRD auch zum IDD fortschreiten kann, der jedoch möglicherweise nicht befriedigend auf Insulintherapie anspricht, solange die zugrunde liegende Insulinresistenz nicht beseitigt wird.

#### **1.8.2.1. Insulin deficiency diabetes**

Pankreatitis, entweder akut oder chronisch, scheint bei einem großen Teil der Hunde mit D. m. für die Zerstörung der  $\beta$ -Zellen verantwortlich zu sein. Alejandro und Mitarbeiter (1988) fanden bei 6 von 18 Hunden mit D. m. histopathologische Anzeichen für eine akute oder chronische Pankreatitis. In einer größeren, retrospektiven Studie, die 221 Hunde umfasste, konnte bei 13 % der Hunde eine akute Pankreatitis festgestellt werden (HESS et al., 2000). Allerdings kann die akute Entzündung der Bauchspeicheldrüse auch eine Folge des D. m. sein.

Humane  $\beta$ -Zellen scheinen gegenüber Entzündungsprozessen der Bauchspeicheldrüse im Vergleich zu  $\alpha$ - oder  $\delta$ -Zellen anfälliger zu sein, so dass



beim Menschen Pankreatitis häufiger zum Verlust der endokrinen als der exokrinen Funktion des Pankreas führt (KLOPPEL et al., 1978). Beim Hund kann die Pankreatitis sowohl zu exokriner Pankreasinsuffizienz (EPI) als auch zum D. m. führen. Da eine definitive Diagnose sowohl der Pankreatitis als auch der (möglicherweise subklinischen) EPI in der Tiermedizin schwierig zu stellen ist, wird dieser Zusammenhang möglicherweise unterschätzt (WATSON, 2003). In den Fällen des IDD, in denen weder eine kongenitale  $\beta$ -Zell-Aplasie (siehe unten), noch der Verdacht auf eine Pankreatitis vorliegt, wird von einer autoimmunen Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas ausgegangen (HOENIG, 2002; FELDMAN & NELSON, 2004; RAND et al., 2004; CATCHPOLE et al., 2005; GALE, 2005). Der tatsächliche histopathologische Nachweis einer Insulitis durch lymphocytäre Infiltration des caninen endokrinen Pankreas konnte jedoch bisher nur selten geführt werden (GEPTS & TOUSSAINT, 1967; ALEJANDRO et al., 1988). Der Nachweis einer durch T-Zellen mediierten Apoptose der  $\beta$ -Zellen wurde bisher nicht erbracht (GALE, 2005). An einer kleinen Gruppe von sechs Hunden konnte jedoch *in vitro* die komplement-vermittelte Zerstörung von  $\beta$ -Zellen in Anwesenheit von Serum diabetischer Hunde gezeigt werden. Wurde das Komplement durch Hitze inaktiviert oder wurden Seren von gesunden Hunden verwendet, kam es nicht zur Zerstörung der Zellen (SAI et al., 1984).

In der Humanmedizin werden Autoantikörper gegen die gesamten Inselzellen, gegen Insulin und die Inselzellantigene GAD65 und IA-2/ICA512 zur Diagnose und zur Vorhersage eines erhöhten Risikos, an autoimmunem D. m. zu erkranken, herangezogen. Bei Hunden mit D. m. konnten in einer Studie Antikörper gegen  $\beta$ -Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz im Serum nachgewiesen werden (HAINES & PENHALE, 1985). In einer nachfolgenden Studie der gleichen Autoren konnten diese Antikörper jedoch auf die Insulinbehandlung zurückgeführt werden; bei Hunden mit neu diagnostiziertem D. m., die noch nie Insulin erhalten hatten, konnten keine Antikörper gegen  $\beta$ -Zellen nachgewiesen werden (HAINES, 1986). Die Behandlung von Hunden mit Insulin führt zur Bildung von Antikörpern sowohl gegen exogen zugeführtes, als auch gegen eventuell noch vorhandenes körpereigenes Insulin (DAVISON et al., 2003). In einer anderen, vorläufigen Studie konnten bei zwölf von 23 Hunden mit spontanem D. m. Antikörper gegen  $\beta$ -Zellen immunhistochemisch im Serum nachgewiesen werden (HOENIG & DAWE, 1992); Untersuchungen an einer größeren Gruppe von Hunden wurden jedoch nicht durchgeführt.

Die Beteiligung von Antikörpern gegen die Inselzellantigene GAD65 und IA-2/ICA512 an einer möglichen autoimmunen Ätiologie des caninen D. m. wird durch die Ergebnisse einer neueren Studie als wahrscheinlich betrachtet (CATCHPOLE et al., 2005). Hier konnten mithilfe eines Radio-Immunopräzipitations-Assays bei sechs von 30 Hunden mit neu diagnostiziertem D. m. Autoantikörper gegen canines GAD65 und bei fünf von 30 Hunden Autoantikörper gegen IA-2 festgestellt werden, wobei zwei der Hunde Reaktivität gegen beide Antigene zeigten.

Insgesamt wurde jedoch sowohl der histopathologische Nachweis einer autoimmunen Insulitis als auch der Nachweis von Autoantikörpern bei Hunden mit IDD noch nicht konsistent geführt. Aktuelle Studien mit größeren Fallzahlen und unter Ausschluss von Tieren mit anderen Gründen für einen D. m. fehlen völlig. Trotz dieses Fehlens eines stringenten Beweises wird von vielen Autoren das Vorliegen einer autoimmunen Pathogenese des D. m. beim Hund angenommen. Vom klinischen Charakter und vom Alter bei Erstdiagnose ausgehend wird die Ätiologie des caninen D. m. als analog zum menschlichen LADA gesehen (HOENIG, 2002; FELDMAN & NELSON, 2004; CATCHPOLE et al., 2005; GALE, 2005).

Verschiedene Autoren berichten von einer kongenitalen  $\beta$ -Zell-Aplasie bei jungen Hunden unter zwölf Monaten, sowohl bei Labrador Retrievern (CATCHPOLE et al., 2005) als auch bei einer Keeshond-Familie (KRAMER et al., 1980).

#### **1.8.2.2. Insulin resistance diabetes**

Wie beim menschlichen Gestationsdiabetes kann es auch beim Hund zu einer durch während der Trächtigkeit ansteigende Konzentration von Progesteron im Blut und der daraus resultierenden Insulinresistenz zum transienten D. m. kommen (NORMAN et al., 2006). Bei weiblichen, unkastrierten Hunden entspricht das Hormonprofil im Diöstrus weitgehend dem der Trächtigkeit, mit einer progesterondominierten Lutealphase, so dass auch nicht-trächtige Hündinnen ein erhöhtes Diabetesrisiko während des Östrus haben.

Progesteron bewirkt ein vermindertes Ansprechen der Körperzellen auf Insulin und stimuliert außerdem die Produktion des ebenfalls diabetogenen Wachstumshormons (GH) in der caninen Milchdrüse. GH bewirkt eine verminderte Aufnahme von Glukose in die Zelle, eine verminderte Glukoseutilisation und vermehrte Glykolyse. Es erhöht damit den Blutzuckerspiegel durch seine direkte insulinantagonistische Wirkung auf den

Glukose- und Fettsäurenmetabolismus in den Fett- und Muskelzellen und in der Leber, aber auch durch bisher unbekannte Wirkungen auf das Insulinsignalling (DOMINICI & TURYN, 2002; GOODMAN, 2003).

Da diese Art des diöstrus-assoziierten D. m. typischerweise bei mittelalten oder älteren Hündinnen auftritt, wird vermutet, dass wiederkehrende Phasen von Insulinresistenz und klinisch unbemerkter Hyperglykämie schließlich zu einer dauerhaften Schädigung der  $\beta$ -Zellen mit Verminderung ihrer Sekretionskapazität und erst dann zu einem klinisch manifesten D. m. führen. Werden Hündinnen bei der ersten Episode eines diöstrus-assoziierten D. m. ovariohysterektomiert, kann die Sekretionskapazität der  $\beta$ -Zellen noch ausreichen, so dass die Störung der Glukosehomöostase vorübergehend bleibt. Sehr häufig sind jedoch bereits so viele  $\beta$ -Zellen zerstört worden, dass ein absoluter Insulinmangel besteht. Die Ovariohysterektomie sollte trotzdem erfolgen, da sonst die nach wie vor bestehende Insulinresistenz eine adäquate Einstellung des D. m. erschwert oder gar unmöglich macht (FELDMAN & NELSON, 2004).

Glukokortikoide wirken ebenfalls diabetogen, Glukokortikoidüberschuss ist folglich ein häufiger Grund für die Entwicklung eines IRD (HESS et al., 2000). Neben einer primären oder sekundären Überfunktion der Nebennierenrinde (beim Hund als Morbus Cushing bezeichnet) ist der iatrogene Hyperadrenokortizismus durch systemische Applikation von Glukokortikoid-Präparaten häufig (CAMPBELL & LATIMER, 1984; JEFFERS et al., 1991).

Bezüglich der Konversion eines IRD in einen IDD gilt für den glukokortikoid-induzierten D. m. das bereits für den gestationsassoziierten D. m. beschriebene, d. h. obwohl es sich primär um eine reversible Insulinabhängigkeit handelt, ist die Zerstörung der  $\beta$ -Zellen durch Hypersekretion und Glukosetoxizität (IMAMURA et al., 1988) bei Erstvorstellung des Patienten teilweise schon so weit fortgeschritten, dass eine Behandlung der Grundkrankheit keine Euglykämie mehr zur Folge hat und eine lebenslange Insulinsubstitution nötig ist. Meist jedoch beseitigt eine erfolgreiche Therapie der Grundkrankheit oder die Beendigung der Glukokortikoidgabe die Symptome des D. m. (RAND et al., 2004).

Fettleibigkeit scheint, im Gegensatz zur Situation beim Menschen und bei der Katze, beim Hund keine Ursache für D. m. zu sein. Zwar verursacht Fettleibigkeit auch beim Hund Hyperinsulinämie und Glukoseintoleranz (MATTHEEUWS et al., 1984), so dass bei adipösen Tieren mit D. m. eine Gewichtsreduktion zum

besseren Ansprechen auf Insulin und damit zu einer niedrigeren Insulindosierung und einer besseren Einstellbarkeit des D. m. führen kann. Bisher fehlt jedoch jeder Hinweis auf einen D. m., der durch Fettleibigkeit ausgelöst wird. Ein dem humanen Typ II Diabetes analoge Krankheit, wie bei der Katze bekannt, scheint beim Hund somit nicht vorzukommen (RAND et al., 2004; CATCHPOLE et al., 2005).

### **1.8.3. Genetische Ursachen des humanen Typ I Diabetes mellitus**

Eineiige Zwillinge von Menschen mit T1DM haben ein Risiko von circa 39 % , ebenfalls an T1DM zu erkranken (REDONDO et al., 2001). Folglich sind neben genetischen Ursachen auch Umwelteinflüsse für das Entstehen des humanen T1DM verantwortlich. Die Genetik des T1DM beim Menschen ist komplex. In den letzten Jahren konnten mindestens 12 an der Vererbung beteiligte Genorte ausgemacht werden (CORDELL & TODD, 1995; GILLESPIE, 2006). Dabei ist die Region des Human Leukocyte Antigen (HLA) für ungefähr 50 % der familiären Häufung des T1DM verantwortlich. Veränderungen in vielen weiteren Kandidatengenen konnten mit T1DM in Verbindung gebracht werden. Wie viel sie zur genetischen Prädisposition beitragen, ist unklar, sie haben jedoch einen viel geringerem Einfluss als der HLA-Genlocus (ONENGUT-GUMUSCU & CONCANNON, 2005).

#### **1.8.3.1. Einfluss des Human-Leukocyte-Antigen-Gens**

Zwei Haplotypen des HLA (DR<sub>4</sub>-DQ8 und DR<sub>3</sub>-DQ2) sind bei 90 % aller Kinder mit T1DM vorhanden. Ein anderer Haplotyp (DR<sub>15</sub>-DQ6) ist bei gesunden Kindern 20 mal häufiger als bei Kindern mit T1DM und scheint damit protektiv zu sein. Der HLA codiert für den Major Histocompatibility Complex (MHC) und ist damit wesentlich für die Antigenpräsentation auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs). Veränderungen im HLA sind mit vielen Autoimmunkrankheiten assoziiert (GILLESPIE, 2006).

#### **1.8.3.2. Einfluss des Insulin-Gens**

Veränderungen im Insulingen auf Chromosom 11 sind zu circa 10 % und damit für den zweitgrößten Anteil an der genetischen Empfänglichkeit für T1DM verantwortlich (GILLESPIE, 2006): Hier scheint eine Variante mit einer längeren Minisatellitensequenz stromaufwärts des Insulingens zu einer verstärkten Insulinexpression im Thymus und damit zu einer effizienteren Toleranzinduktion der T-Zellen und nachfolgend geringerer Aktivität gegen körpereigenes Insulin zu führen (VAFIADIS et al., 1997).

### **1.8.3.3.Einfluss des Lymphoid-Tyrosin-Phosphatase-Gens**

Ein weiterer Polymorphismus, der für etwa 2 % der familiären Häufung verantwortlich gemacht werden kann, ist die C1858T-Variante des PTPN22-Gens auf Chromosom 1p13, das für die Lymphoid-Tyrosin-Phosphatase (LYP) kodiert (BOTTINI et al., 2006). Die LYP spielt eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-Aktivierung, und die mit T1DM assoziierte Variante könnte zu besseren Überlebenschancen der T-Zellen bei der negativen Selektion im Thymus führen und damit zu einer erhöhten autoimmunen Aktivität dieser Zellen in der Peripherie (VANG et al., 2005). Der durch die Mutation entstehende Aminosäureaustausch an Position 620 des PTNP22-Gens korreliert in vielen Populationen stark mit der Inzidenz von T1DM und anderen Autoimmunerkrankungen (BOTTINI et al., 2004; SMYTH et al., 2004; ZHENG & SHE, 2005).

### **1.8.3.4.Einfluss des Cytotoxic-T-Lymphocyte-Antigen-4-Gens**

Das für CTLA4 kodierende Gen liegt beim Menschen auf dem Chromosom 2q33. Ein erhöhtes Risiko für T1DM und andere Autoimmunkrankheiten konnte in mehreren Studien mit Polymorphismen im CTLA4-Gen in Zusammenhang gebracht werden (NISTICO et al., 1996; DONNER et al., 1997; MARRON et al., 1997; HOLMBERG et al., 2005). Allerdings wurde dieser Zusammenhang nicht in allen untersuchten humanen Populationen gefunden (VAIDYA & PEARCE, 2004). Das CTLA4-Gen spielt offensichtlich eine untergeordnete Rolle bei der Erbllichkeit des T1DM und wird eventuell erst im Zusammenspiel mit bestimmten Hochrisiko-Allelen des HLA relevant. CTLA4 ist ein auf der Oberfläche von T-Zellen exprimierter Aktivator der T-Zell-Funktion. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass CTLA4 entscheidend ist für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz im Körper. Mutationen im CTLA4-Gen könnten für Autoimmunerkrankungen prädisponieren (CHAMBERS et al., 1999).

### **1.8.3.5.Einfluss des Vitamin-D-Rezeptor-Gens**

Die vielfältigen Wirkungen von Vitamin D auf das Immunsystem und auf die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas werden in Abschnitt II.3.3. genauer beschrieben. Ein großer Teil dieser Wirkungen wird über den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) vermittelt, so dass nicht nur Vitamin-D-Mangel, sondern auch Polymorphismen im Gen des VDR zur Regulation von Autoimmunität durch Vitamin D beitragen könnten.

Eine, wenn auch schwache, Assoziation von Polymorphismen im VDR-Gen mit T1DM konnte in verschiedenen Studien in einigen humanen Populationen nachgewiesen werden (CHANG et al., 2000; PANI et al., 2000; XIAO et al., 2006), in anderen Populationen gelang dieser Nachweis nicht (TURPEINEN et al., 2003; NEJENTSEV et al., 2004). Möglicherweise beeinflussen hier Umweltfaktoren das mit dem Genotyp verbundene Erkrankungsrisiko (REIS et al., 2005).

#### **1.8.4. Genetische Ursachen beim Hund**

Abgesehen von den Verhältnissen bei der kongenitalen  $\beta$ -Zell-Aplasie bei einer Keeshond-Familie, bei der ein autosomal rezessiver Erbgang wahrscheinlich ist (KRAMER et al., 1988), und einem gehäuften Auftreten von IDD bei zwei Samoyeden-Familien (KIMMEL et al., 2002) und einer Zwergpudel-Familie (GERSHWIN, 1975) ist bisher wenig über die genetischen Hintergründe des D. m. beim Hund bekannt. Da es jedoch eine Rasseprädisposition gibt, ist eine Beteiligung erblicher Faktoren an der Pathogenese des caninen D. m. sehr wahrscheinlich; mehrere aktuelle Studien fanden in verschiedenen Populationen Rassen mit erhöhtem Risiko (HESS et al., 2000; GUPTILL et al., 2003; CATCHPOLE et al., 2005).

In bisher zwei Studien konnten genetische Assoziationen des Dog Leukozyte Antigen (DLA), das für den Major Histocompatibility Complex II (MHC II) codiert, mit D. m. beim Hund nachgewiesen werden (CATCHPOLE et al., 2005; KENNEDY et al., 2006). Die Studie von Kennedy und Mitarbeitern (2006) umfasste 460 Hunde mit D. m. sowie 1047 gesunde Kontrolltiere. Sie konnte den bereits an einer kleineren Tiergruppe gezeigten Zusammenhang (CATCHPOLE et al., 2005) zwischen Allelen, die für die Aminosäure Arginin an Position 55 des DLA-DQA1-Locus kodieren und einem erhöhten Risiko für D. m. bestätigen. 84,5 % der Hunde mit D. m. im Vergleich zu 74,8 % der Kontrolltiere trugen die entsprechende Mutation, und die Wahrscheinlichkeit, an D. m. zu erkranken ist für die Träger dieses Allels 1,82 mal höher (KENNEDY et al., 2006). Des Weiteren konnten drei Haplotypen (Kombinationen von Allelen) des DLA-Locus gefunden werden, die mit einem erhöhten Risiko für D. m. assoziiert sind: DRB1\*009/DQA1\*001/DQB1\*008, DRB1\*015/DQA1\*006/DQB1\*023 sowie DRB1\*002/DQA1\*009/DQB1\*001. Im Gegensatz dazu scheint der DQA1\*004/DQB1\*013-Haplotyp protektiv zu wirken; er wurde bei gesunden Hunden signifikant häufiger gefunden als bei erkrankten (16,5 % der Hunde mit

D. m., 23,1 % der gesunden Hunde, odds ratio = 0,66,  $p$ -Wert < 0,005) (KENNEDY et al., 2006). Die Nomenklatur der Haplotypen erfolgte anhand der Richtlinien der International Society for Animal Genetics (ISAG) (KENNEDY et al., 2001).

## **2. Entstehung von Autoimmunität**

Da die antigenbindenden Rezeptoren von sowohl B- als auch T-Lymphozyten durch Umlagerung von Genen, Kombination von verschiedenen Ketten im Immunglobulinmolekül und somatische Mutation zufällig generiert werden, bleibt die Entstehung von Zellen, deren Erkennungsmerkmale spezifisch gegen körpereigene Antigene gerichtet sind, nicht aus. Sowohl B- als auch T-Lymphozyten werden Selektionsschritten unterzogen, die einerseits ausreichende Aktivität gegen körperfremde Antigene sicher stellen und andererseits weitgehende Toleranz den körpereigenen Geweben gegenüber gewährleisten (GRAWUNDER et al., 1998).

### **2.1. Toleranzinduktion von T-Zellen**

Während der Reifung im Thymus beginnen T-Zellen, antigenbindende Rezeptoren auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Im ersten Selektionsschritt, der positiven Selektion, überleben nur Zellen, die den körpereigenen MHC-Rezeptor erkennen können. Eine zu starke oder zu schwache Bindung führt zur Apoptose dieser Zellen (ALIAHMAD & KAYE, 2006).

Die Epithelzellen des Thymus exprimieren nicht nur thymusspezifische Proteine, sondern auch Antigene, deren Expression eigentlich nur auf bestimmte Organe beschränkt ist, zum Beispiel Insulin oder Thyreoglobulin (ANDERSON et al., 2005). Außerdem nehmen APCs körpereigene Antigene in anderen Geweben auf und präsentieren sie den T-Zellen im Thymus, die so Kontakt mit nahezu allen Proteinen des Körpers bekommen. Eine zu starke Bindung an diese Autoantigene führt zur Apoptose der autoreaktiven T-Zellen. Diese als klonale Deletion bezeichnete negative Selektion gewährleistet weitgehende Toleranz der T-Zellen gegenüber körpereigenen Geweben (VON BOEHMER & KISIELOW, 2006).

Die Antigene mancher Gewebe (Auge, Gehirn, Hoden) werden nicht im Thymus exprimiert, so dass keine immunologische Toleranz gegenüber diesen Geweben ausgebildet wird. Da diese Organe immunprivilegiert, d. h. physiologischerweise vor der Exposition gegenüber Lymphozyten geschützt sind, kommt es nur zu einer Autoimmunreaktion, wenn aufgrund eines Krankheitsprozesses (z. B.

Linsenruptur) die histologische Trennung dieser Gewebe vom Immunsystem aufgehoben wird (ONO, 2003).

Die negative Selektion im Thymus ist jedoch nicht vollständig, so dass immer wieder auch autoreaktive T-Zellen überleben. Diese werden, wenn sie an freies Antigen oder den MHC von APCs binden, die keine kostimulatorischen Signale exprimieren, durch das Fehlen dieser Kostimulation in Apoptose getrieben. Dieser Prozess gewährleistet die Aufrechterhaltung einer peripheren Selbsttoleranz auch außerhalb des Thymus und wird als klonale Anergie bezeichnet (SINGH et al., 2006).

## **2.2. Toleranzinduktion von B-Zellen**

Die Reifung von B-Zellen vollzieht sich im Gegensatz zu der der T-Zellen in zwei Phasen. Im Knochenmark kommt es zur Rekombination von Gensegmenten der für die variablen Ketten der Immunglobuline codierenden Gene. In sekundären lymphatischen Organen entsteht die Rezeptorvariabilität durch somatische Mutation (GRAWUNDER et al., 1998).

Wenn eine unreife B-Zelle ein körpereigenes Antigen bindet, kommt es zum Stillstand der Entwicklung und zur Apoptose. Dieser Vorgang nennt sich B-Zell-Anergie. Dabei genügt sehr wenig Antigen zur Toleranzinduktion. Reife autoreaktive B-Zellen können durch klonale Deletion, d. h. die Bindung an Antigen ohne kostimulatorische Signale, in Apoptose getrieben und so unschädlich gemacht werden. Hierzu werden allerdings sehr viel größere Mengen an Antigen benötigt als bei der B-Zell-Anergie (RATHMELL et al., 1998).

Wenn B-Zellen mit sehr großen Mengen an Antigen konfrontiert werden, wandeln sich alle B-Zellen in Plasmazellen um, so dass keine Gedächtniszellen übrig bleiben und auf nachfolgende Antigenapplikation reagieren können. Dieser Mechanismus der Toleranzinduktion wird als klonale Erschöpfung bezeichnet. Die B-Zell-Toleranz dauert sehr viel kürzer und ist schwieriger aufrecht zu erhalten als die T-Zell-Toleranz, da jedoch B-Zellen zur effektiven Autoantikörperproduktion entsprechende autoreaktive T-Helferzellen benötigen, beziehungsweise niedrig affine Autoantikörper auch nicht effektiv an körpereigene Proteine binden, scheint die Aufrechterhaltung der T-Zell-Toleranz der entscheidendere Mechanismus zur Verhinderung der Autoimmunität im Körper zu sein (NOSSAL, 1988, 1991).



### 2.3. Zusammenhang zwischen Diabetes und Autoimmunität

Beim Menschen wird die Pathogenese des T1DM in sechs Stadien eingeteilt: Zuerst muss eine genetische Prädisposition vorliegen (Stadium 1), dann vermittelt ein auslösendes Moment (Stadium 2) den Übergang zur Phase der aktiven Autoimmunität mit noch normaler Insulinsekretion (Stadium 3). In der vierten Phase führt die autoimmune Entzündung der  $\beta$ -Zellen zu einer verminderten Insulinsekretion, der D. m. ist jedoch noch nicht manifest, da die Restinsulinsekretion ausreicht, um die Glukosehomöostase aufrechtzuerhalten. Erst in der fünften Phase kommt es zum manifesten D. m., wobei die  $\beta$ -Zellen noch eine residuale Insulinsekretion aufweisen. Das sechste und letzte Stadium besteht aus völliger Zerstörung der  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse, die damit auch kein Insulin mehr produzieren kann (BABAYA et al., 2005).

Als auslösendes Moment für den Beginn der aktiven Autoimmunität werden beim Menschen virale Infektionen (Enterovirus, Coxsackievirus) aufgrund von epidemiologischen Studien für sehr wahrscheinlich gehalten, die genauen molekularen Mechanismen sind jedoch nicht bekannt (CLEMENTS et al., 1995; HYOTY & TAYLOR, 2002). Ein Zusammenhang mit Impfungen oder, wie in früheren Studien vermutet, der Aufnahme von Kuhmilch und dem Ausbruch von T1DM beim Menschen scheint jedoch nicht zu bestehen (ATKINSON & ELLIS, 1997; CLASSEN & CLASSEN, 1999; PERSAUD & BARRANCO-MENDOZA, 2004).

Beim T1DM des Menschen erfolgt die aktive Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas durch eine autoimmunvermittelte Insulitis, d. h. einer Infiltration mit mononukleären Zellen (vor allem  $CD8^+$ -T-Zellen und Makrophagen, jedoch auch B-Zellen und  $CD4^+$ -T-Zellen) (ITOH et al., 1993). Die eingewanderten Zellen sezernieren Zytokine (Interleukin- $1\beta$ , Interferon- $\gamma$ ) sowie Entzündungsmediatoren wie Stickoxid (NO). Diese Zytokine, die auch zur Nekrose von  $\beta$ -Zellen führen, sowie die T-Zell-vermittelte Apoptose und Zytolyse scheinen hauptverantwortlich für das Aufrechterhalten der Insulitis und die völlige (und zielgerichtete) Zerstörung der  $\beta$ -Zellen zu sein. Der genaue Mechanismus dieser Zerstörung sowie die Rolle der Autoantikörper und der B-Zellen ist bislang genauso unbekannt wie der eigentliche Auslöser der Insulitis (TODARO et al., 2004).

Die vorherrschende Immunantwort während der aktiven Phase der Insulitis und der nachfolgenden Zerstörung der  $\beta$ -Zellen ist dominiert von den Zytokinen, die von Th1-Zellen sezerniert werden, hauptsächlich Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$

(IFN- $\gamma$ ), und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Dies führt zur Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und Makrophagen und zu deren verstärkter Einwanderung in  $\beta$ -Zellen (ALMAWI et al., 1999).

$\beta$ -Zellen sind normalerweise vor rezeptorvermittelter Apoptose geschützt, da sie die entsprechenden Rezeptoren nicht exprimieren. Die Sekretion von Interleukin-1 $\beta$  und Interferon- $\gamma$  sowie NO durch die eingewanderten mononukleären Zellen führt jedoch zur Expression des CD95(*fas*)- und anderer sogenannter „Todes“-Rezeptoren. Autoreaktive T-Zellen, die den CD95-Liganden produzieren, führen nun zu massivem programmierten Zelltod von  $\beta$ -Zellen, die den CD95-Rezeptor tragen, bei gleichzeitigem Überleben der  $\alpha$ - und  $\delta$ -Zellen, die diesen Rezeptor nicht exprimieren (STASSI et al., 1997). In früheren Studien wurden Th2-Zellen und deren Zytokine (Interleukin-10, Interleukin-4) eine protektive Rolle im Entzündungsprozess zugeschrieben (ZEKZER et al., 1997). Laut neueren Untersuchungen scheinen Th2-Zellen jedoch sowohl Nekrose von  $\beta$ -Zellen als auch die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen und B-Zellen zu fördern (ALMAWI et al., 1999).

Da Hunde meist erst mit einem manifesten D. m., d. h. in Stadium fünf oder sechs vorgestellt werden, ist der Nachweis eines ähnlichen Verlaufes beim caninen D. m. bisher nicht gelungen; er wird jedoch vermutet (FELDMAN & NELSON, 2004; GALE, 2005). Es konnte lediglich der histopathologische Nachweis einer totalen Zerstörung der  $\beta$ -Zellen geführt werden (GEPTS & TOUSSAINT, 1967; ALEJANDRO et al., 1988)

### **3. Vitamin D**

Die essentielle Rolle von Vitamin D bei der Regulation des Calcium-, Phosphor- und Knochenstoffwechsels ist seit langem bekannt (HAVARD & HOYLE, 1928). In neuerer Zeit werden diesem Hormon jedoch auch wichtige Funktionen bei der Regulation des Immunsystems, bei der Insulinsekretion und bei der Entstehung von Tumoren zugeschrieben (NORMAN, 2006).

#### **3.1 Vitamin-D-Bildung**

Die hormonell aktive Form des Vitamin D ist das 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D<sub>3</sub>, auch als Calcitriol bezeichnet. Seine Vorstufe, das Vitamin D<sub>3</sub>, wird beim Menschen in der Haut unter UV-Lichteinstrahlung aus 7-Dehydrocholesterol (7-DHC) gebildet, kann jedoch auch aus dem Darm aufgenommen werden. Die Eigensynthese von Vitamin D<sub>3</sub> ist unter normalen Umständen für den Bedarf des Körpers

ausreichend, so dass Vitamin D für den Menschen strenggenommen kein Vitamin im eigentlichen Sinne darstellt (HOLICK et al., 1980).

Das 7-DHC wird durch die Photoenergie des UV-Lichts in der Epidermis, vor allem im Stratum basale und im Stratum spinosum, in Provitamin D umgewandelt, welches zu Vitamin D<sub>3</sub> isomerisiert (HOLICK, 1988). Dieses wird durch einen bisher nicht genau aufgeklärten Mechanismus aus der Zelle transportiert (HOLICK, 1981), wo es hauptsächlich an das Vitamin-D-spezifische Transportprotein gebunden wird, zu einem kleinen Teil auch an Albumin und Lipoproteine. Das in der Leber produzierte Vitamin-D-Bindungsprotein (VDBP) bindet Vitamin D mit einer hohen Affinität und macht das hydrophobe Molekül für den Transport zu seinen Zielorganen plasmalöslich (HADDAD et al., 1993).

Hunden fehlt die Möglichkeit der kutanen Vitamin-D<sub>3</sub>-Synthese, so dass diese Vitamin D<sub>3</sub> aus der Nahrung über den Darm aufnehmen müssen (HOW et al., 1994).

Vitamin D<sub>3</sub> selbst hat noch keine biologische Aktivität, sondern benötigt zwei Hydroxilierungsschritte zur seiner Aktivierung. Der erste Hydroxilierungsschritt findet in den Hepatozyten statt. Hier wird mithilfe einer mitochondrialen Hydroxylase das 25(OH)Vitamin D<sub>3</sub> (25-Hydroxycholecalciferol) gebildet. Die endgültige Umwandlung in seine biologisch aktive Form erfährt das 25(OH)Vitamin D<sub>3</sub> dann in der Niere. Die renale 1 $\alpha$ -Hydroxylase führt eine (OH)-Gruppe an Position des 25(OH)Vitamin D<sub>3</sub> ein und wandelt es so zum 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D<sub>3</sub> (1,25-Dihydroxycholecalciferol) um. Beide Hydroxylasen sind Cytochrom-p450-abhängig (WIKVALL, 2001; LIPS, 2006). Die Synthese in der Haut wird nur durch den Transport aus der Zelle begrenzt. Die hepatische Hydroxilierung wird lediglich durch eine negative Rückkoppelung des 25(OH)Vitamin D<sub>3</sub> auf seine Hydroxylase reguliert, wohingegen die Synthese von 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D<sub>3</sub> in sehr engen Grenzen auf den Calcium- und Phosphorbedarf des Körpers abgestimmt wird (OMDAHL et al., 2002).

### **3.2 Vitamin-D-Regulation**

Das von der Nebenschilddrüse gebildete Parathormon (PTH) aktiviert die renale 1 $\alpha$ -Hydroxylase, und führt damit zur vermehrten 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Produktion. Eine Hyperphosphatämie und hohe 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel hemmen die Aktivität der 1 $\alpha$ -Hydroxylase. Niedrige Calciumwerte im Blut stimulieren die Ausschüttung von PTH und führen so zu erhöhter 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Produktion. Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die

vermehrte Umwandlung von  $25(\text{OH})\text{Vitamin D}_3$  in  $24,25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$ , einem Metaboliten mit sehr geringer Affinität am Vitamin-D-Rezeptor und ohne Wirkung auf die Calciumhomöostase. Die Deaktivierung in den Zielzellen geschieht durch Hydroxylierung des  $1,25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$  an Position 24 und Bildung von  $1,24,25(\text{OH})_3\text{Vitamin D}_3$ , das zu Calcitronsäure verstoffwechselt und schließlich über die Galle ausgeschieden wird (PROSSER & JONES, 2004).

### 3.3 Vitamin-D-Wirkung

Die Hauptaufgabe von  $1,25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$  ist die Regulation des Blutcalciumspiegels. Es fördert die Calciumaufnahme aus dem Dünndarm durch aktive Aufnahme in die Dünndarmzelle über Calciumkanäle, durch Erleichterung des Transportes durch die Zelle und eine erhöhte Sekretion ins Blutgefäßsystem (HOENDEROP et al., 2005). Die Aufnahme von Phosphat aus dem Dünndarm wird, unter anderem durch die verstärkte Expression eines Natrium-Phosphat-Kotransporters, ebenfalls gefördert (DANISI et al., 1980). Die Effekte von  $1,25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$  auf die Niere sind umstritten, da sie nicht einfach von den Effekten des Hormons auf die Aufnahme von Calcium und Phosphat aus dem Darm und der Beeinflussung des PTH-Spiegels zu trennen sind. Eine Erhöhung der Rückresorptionsrate von Calcium durch  $1,25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$  in den Nierentubuli konnte jedoch gezeigt werden (YAMAMOTO et al., 1984), die Erhöhung der Phosphatreabsorption durch  $1,25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$  scheint hingegen auf der Unterdrückung der PTH-Sekretion durch  $1,25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$  zu beruhen (DUSSO et al., 2005).  $1,25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$  stellt zusammen mit PTH Calcium und Phosphat für den Knochenaufbau bereit, fördert die Bildung von Knochenmatrix und deren Mineralisierung, hemmt die Osteoklastentätigkeit und ist so essentiell für den normalen Knochenaufbau. Ein Vitamin-D<sub>3</sub>-Mangel im Kindheitsalter führt zur Rachitis, im Alter zur Osteomalazie (PANDA et al., 2004). Diese sogenannten „klassischen“ Vitamin-D-Wirkungen werden über den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) vermittelt, ein intrazellulärer Steroidrezeptor, der als ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor an die DNA bindet und die Transkription von bestimmten Genen initiieren oder hemmen kann (YAMADA et al., 2003). Er besteht aus einer DNA-Bindungsdomäne und einer Liganden-Bindungsdomäne.  $1,25(\text{OH})_2\text{Vitamin D}_3$  bindet intrazellulär an den VDR, bewirkt eine Konformationsänderung und durch die Zusammenlagerung mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) die Bildung eines Heterodimers. Dieses Heterodimer bindet nun mit Hilfe der aus zwei „Zinkfinger“-Motiven bestehenden DNA-Bindungsdomäne

an Transkriptionselemente in der DNA der Zielgene. Diese Transkriptionselemente, auch als „vitamin D responsive elements“ (VDRE) bezeichnet, liegen in der Promoterregion der von Vitamin D regulierten Gene. Manche VDREs reagieren auf gebundenes Vitamin D mit einer vermehrten Transkription. Zu den vermehrt transkribierten Genen gehören unter anderem das Gen für Osteocalcin, ein Protein der Knochenmatrix, oder das für die Calciumaufnahme wichtige Calbindin. PTH, IL-2 oder TNF- $\alpha$  beispielsweise besitzen hingegen VDREs die mit einer verminderten Transkription auf die Bindung von Heterodimeren reagieren (DUSSO et al., 2005; NAGPAL et al., 2005).

Eine weitere Eigenschaft des VDR ist die Fähigkeit zur Bindung von Cotranskriptionsfaktoren mit Hilfe seiner Transaktivierungsdomäne. Die gebundenen Transkriptionsfaktoren modulieren den Einfluss des Heterodimers auf die Transkription und erleichtern die Initiation der Transkription (GLASS et al., 1997).

Neben diesen „klassischen“, genomvermittelten Wirkungen löst 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D<sub>3</sub> sogenannte nichtgenomische Effekte aus (NAGPAL et al., 2005; NORMAN, 2006). Diese nichtgenomischen Effekte führen innerhalb kürzester Zeit zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, einer Erhöhung der cGMP-Spiegel und zur Aktivierung der Proteinkinase C (NAGPAL et al., 2005). Ob diese Effekte über den klassischen intrazellulären VDR, einen membrangebundenen VDR oder VDR-unabhängig vermittelt werden, wird zurzeit diskutiert (HUHTAKANGAS et al., 2004; NGUYEN et al., 2004). Die wichtigsten „nichtklassischen“ Effekte sind die schnelle Stimulation der Kalzium-Aufnahme im Darm (Transcaltachia), die Förderung der Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas, sowie die Stimulation der Differenzierung verschiedener Zelltypen (LI et al., 2004; NAGPAL et al., 2005).

#### **4. Zusammenhang zwischen Vitamin D, Autoimmunität und Diabetes**

1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D<sub>3</sub> führt zu einer verminderten Zahl von Th1-Zellen, unterdrückt deren Funktion und erhöht die Zahl der Th2-Zellen sowie der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen und fördert deren Funktion; somit wirkt 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin D<sub>3</sub> tolerogen und verhindert überschüssige Reaktionen des Immunsystems gegen körpereigene Antigene (CANTORNA et al., 1998; BOONSTRA et al., 2001).

Den mit der Bildung von Th1-Zellen assoziierten Zytokinen (IL-2, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) wird eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der autoimmunen Prozesse beim T1DM zugeschrieben (CANTORNA & MAHON, 2004). Die Rolle der Th2-Zellen bei der autoimmunen Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas ist unklar. Im allgemeinen wird ihnen durch Sekretion von IL-4 und IL-10 und die Hemmung der Th1-Antwort eine protektive Rolle im autoimmunen Prozess zugeschrieben (RAPOPORT et al., 1993; PENNLINE et al., 1994). Es gibt jedoch auch Studien, laut denen Th2-Zellen sowohl Nekrose von  $\beta$ -Zellen als auch die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen und B-Zellen zu fördern scheinen (ALMAWI et al., 1999; WALBANGO et al., 2006).

1,25(OH) $_2$ Vitamin D $_3$  verhindert außerdem *in vitro* die Apoptose von  $\beta$ -Zellen über den CD95(*fas*)-Rezeptorweg, den Hauptweg der  $\beta$ -Zell-Zerstörung beim T1DM (RIACHY et al., 2006). Epidemiologische Studien stützen den Verdacht, dass ein Mangel an Vitamin D mit einer erhöhten Inzidenz von Autoimmunkrankheiten korreliert. Autoimmunkrankheiten wie Multiple Sklerose (MS) und Inflammatory Bowel Disease (IBD) sind in Kanada, dem Norden der USA und in Europa häufiger als in südlichen Ländern mit höherer Sonneneinstrahlung. Dies spricht für eine mögliche Rolle von Vitamin-D-Mangel in der Ätiologie dieser Krankheiten. Für die Inzidenz von MS konnte eine negative Korrelation mit der Vitamin-D-Aufnahme festgestellt werden (MUNGER et al., 2004).

In einer finnischen Studie hatten Menschen, deren Nahrung in der Kindheit täglich mit 2000 IU Vitamin supplementiert wurde, ein signifikant niedrigeres Risiko, an T1DM zu erkranken als Kinder ohne Nahrungsergänzung (HYPPONEN et al., 2001). Die Verabreichung von Vitamin-D-reichem Lebertran während des ersten Lebensjahres vermindert ebenfalls das Risiko an T1DM zu erkranken (STENE & JONER, 2003). Ob diese Reduktion der Inzidenz von Autoimmunkrankheiten durch Vitamin-D-Supplementierung jedoch ein Effekt von supraphysiologischen Vitamin-D-Spiegeln ist oder nur der Verhinderung eines Mangelzustandes geschuldet ist, ist bisher nicht geklärt (MATHIEU et al., 2005).

### **III. Material & Methoden**

#### **1. Tiere**

Um die Häufigkeit von Polymorphismen im Genom und die Vitamin-D-Spiegel von Hunden mit D. m. mit denen von gesunden Hunden vergleichen zu können, wurden sowohl Hunde mit D. m., als auch eine gesunde Kontrollgruppe untersucht.

##### **1.1. Hunde mit Diabetes mellitus**

In die Studie aufgenommen wurden 51 Hunde mit D. m. im Zeitraum von Februar 2005 bis Dezember 2006. 22 Hunde wurden an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwigs-Maximilians-Universität München ambulant oder stationär behandelt, Proben von 13 Hunden wurden freundlicherweise von Dr. F. Zeugswetter, Klinik für Interne Medizin und Seuchenlehre der Veterinärmedizinischen Universität Wien (VUW) zur Verfügung gestellt. C. Wondratschek und Frau Prof. Dr. B. Kohn aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin stellten dankenswerterweise sechs Proben zur Verfügung, die restlichen zehn Proben wurden von praktischen Tierärzten aus dem Raum München eingesandt. Entweder wurde die Diagnose D. m. beim überweisenden Tierarzt gestellt und in der Klinik bestätigt, oder die Erstdiagnose wurde in der Klinik gestellt.

##### **1.1.1. Diagnose**

Eine persistente Nüchternhyperglykämie (Blutglukose  $> 6,27$  mmol/l) sowie Glukosurie wurden als diagnostische Kriterien herangezogen. Die persistente Hyperglykämie wurde anhand des Fruktosaminwertes dokumentiert (Referenzbereich  $< 370$   $\mu$ mol/l, Hunde mit D. m.  $> 370$   $\mu$ mol/l).

Je nach klinischer Präsentation des Patienten wurden weitergehende Untersuchungen angeschlossen (Blutbild mit Differentialblutbild, Serumprofil, Ultraschalluntersuchung des Abdomens und des Herzens, röntgenologische Untersuchung von Thorax und Abdomen), um ursächliche Krankheiten oder Begleiterkrankungen zu diagnostizieren.

##### **1.1.2. Altersstruktur**

Das Alter der Hunde bei Vorstellung in der Klinik lag im Mittel bei 10,3 Jahren mit einer Spanne von sechs - 15 Jahren (Median 10 Jahre). Dieses Alter entspricht dem Alter der Hunde bei Aufnahme in die Studie und nicht dem Alter bei Erstdiagnose, da viele Tiere schon vor Beginn der Studie an der Klinik behandelt

wurden oder von praktischen Tierärzten erst bei Auftreten von Komplikationen an die Klinik überwiesen wurden.

### 1.1.3. Rassen- und Geschlechtsverteilung

13 Hunde waren Mischlinge; die am häufigsten vertretenen Rassehunde waren Dackel, West Highland White Terrier und Pudel (je vier Patienten) sowie Deutsche Schäferhunde (drei Patienten, siehe Tab. 2). Am häufigsten vertreten waren kleine Terrierrassen (West Highland White Terrier, Yorkshire Terrier, Jack Russel Terrier sowie Welsh Terrier und Scotch Terrier mit insgesamt zehn Patienten).

Die Rassen der Hunde aus der Medizinischen Kleintierklinik München sind in Tab. 3 gesondert aufgeführt, um sie mit den häufigsten Rassen des gesamten Patientengutes der Medizinischen Kleintierklinik im Studienzeitraum vergleichen zu können. 28 Hunde mit D. m. waren weiblich, davon 15 kastriert und 13 unkastriert, 23 Hunde mit D. m. waren männlich, davon elf kastriert und zwölf unkastriert.

Tab. 2: Die häufigsten Rassen der Hunde mit Diabetes mellitus (gesamte Studienpopulation)

| Rasse                       | Anzahl |
|-----------------------------|--------|
| Mischling                   | 13     |
| Dackel                      | 4      |
| Pudel                       | 4      |
| West Highland White Terrier | 4      |
| Rottweiler                  | 3      |
| Deutscher Schäferhund       | 3      |
| Yorkshire Terrier           | 2      |
| Jack Russel Terrier         | 2      |
| Sonstige                    | 16     |



Tab. 3: Die häufigsten Rassen der Hunde mit Diabetes mellitus (D. m.) an der Medizinischen Kleintierklinik München

| <b>5 häufigste Rassen der Hunde mit D. m. an der Medizinischen Kleintierklinik München im Zeitraum Februar 2005 bis Dezember 2006</b>      |               |
|--|---------------|
| <b>Rasse</b>   | <b>Anzahl</b> |
| Mischling  | 6             |
| West Highland White Terrier  | 3             |
| Dackel   | 2             |
| Pudel  | 2             |
| Andere Terrier   | 2             |
| <b>5 häufigste Rassen der Gesamtpatienten der Medizinischen Kleintierklinik in 2 Jahren (Jahresdurchschnitt der Jahre 2002 – 2004 x 2)</b> |               |
| <b>Rasse</b>   | <b>Anzahl</b> |
| Mischling  | 726           |
| Deutscher Schäferhund  | 258           |
| Golden Retriever   | 124           |
| Yorkshire Terrier  | 116           |
| Dackel   | 88            |

#### 1.1.4. Begleitkrankheiten

Vier der 22 an der Medizinischen Kleintierklinik München vorgestellten Hunde litten bereits an einer DKA. Bei fünf der Hunde wurde eine Pankreatitis diagnostiziert. Eine diabetische Katarakt lag ebenfalls bei fünf der 22 Hunde vor. Drei der Hunde litten an Hyperadrenokortizismus. Nur zwei der Hunde hatten zum Zeitpunkt der Vorstellung an der Klinik eine Harnwegsinfektion. Bei zwei der Patienten wurde im Herzultraschall eine Mitralklappeninsuffizienz diagnostiziert, bei einem zusätzlich mit Subaortenstenose und Aortenklappeninsuffizienz. Ein Hund verstarb einige Monate nach Vorstellung in der Klinik an einem Hämangiosarkom.

#### 1.2. Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 77 klinisch gesunden Hunden aus dem Großraum München. Bei allen Hunden der Kontrollgruppe lagen keine klinischen Hinweise auf D. m. vor und der Blutzuckerwert lag im Referenzbereich ( $< 6,27$  mmol/l). Das Alter der Kontrollgruppe reichte von eins bis 14 Jahren, mit einem Mittelwert von 5,6 Jahren (Median 6 Jahre) Die häufigsten Rassen sind in Tab. 4 angegeben.

Tab. 4 Häufigste Rassen der Kontrollgruppe

| Häufigste Rassen der Kontrollgruppe | Anzahl |
|-------------------------------------|--------|
| Dobermann                           | 10     |
| Mischling                           | 8      |
| Beagle                              | 6      |
| Australian Shepherd                 | 4      |
| Norwich Terrier                     | 4      |
| West Highland White Terrier         | 3      |
| Airedale Terrier                    | 3      |
| Pudel                               | 3      |
| Border Collie                       | 3      |
| Yorkshire Terrier                   | 2      |
| Jack Russel Terrier                 | 2      |
| Border Terrier                      | 2      |
| Collie                              | 2      |
| Rottweiler                          | 2      |
| Deutsch Langhaar                    | 2      |
| Golden Retriever                    | 2      |
| Labrador Retriever                  | 2      |
| Sonstige                            | 17     |

## 2. Methoden

Alle Laborarbeiten wurden, falls nicht anders angegeben, im Labor des Instituts für Tierphysiologie der LMU München unter Leitung von Dr. Karin Weber durchgeführt.

### 2.1. Probenentnahme

Allen Hunden mit D. m., die an der Medizinischen Kleintierklinik München vorgestellt wurden, wurden an der Vena cephalica antebrachii, der Vena saphena oder an der Vena jugularis 6 ml Blut abgenommen, davon 4 ml in Röhrchen, die mit dem Gerinnungshemmer EDTA versetzt waren und 2 ml in Serumröhrchen. Das Serum wurde abzentrifugiert, der Blutglukose- und Fruktosaminwert bestimmt und das restliche Serum bei -20 °C eingefroren. 2 ml des EDTA-Blutes wurden bis zur DNA-Isolation bei 4 °C gelagert, 2 ml wurden sofort zentrifugiert; das Plasma wurde bei -80 °C eingefroren.

An der Klinik für Innere Medizin und Seuchenlehre der VUW wurden jedem Hund mit D. m. 4 ml Blut entnommen, davon 2 ml in EDTA, welches per Post nach München gesandt wurde. Von 2 ml Blut pro Hund wurde das Serum abzentrifugiert, bei -80 °Celsius tiefgefroren und auf Trockeneis in die

Medizinische Kleintierklinik transportiert. Da alle anderen Probenlieferanten keine lückenlose Kühlkette gewährleisten konnten, wurde von allen anderen Hunden kein Serum untersucht, sondern lediglich 2 ml EDTA-Blut per Post an die Medizinische Kleintierklinik gesandt.

## **2.2. DNA-Isolation**

Aus 2 ml EDTA-Vollblut wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen DNA-Isolationskits (Versagene Genomic DNA Purification Kit, Gentra Systems, Minneapolis, USA) die in den kernhaltigen Zellen des Blutes, den peripheren Blut-Leukozyten, vorliegende DNA isoliert. Die isolierte DNA wies eine Konzentration von mindestens 0,1 µg/µl auf und wurde im Elutionspuffer (TE, 10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7) bei -20 °Celsius gelagert.

## **2.3. 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Bestimmung**

Aus tiefgefrorenem (-80 °C) EDTA-Plasma wurden die 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel von 13 Hunden mit D. m. bestimmt. Da eine sofortige Bearbeitung des Blutes für die korrekte Messung erforderlich war, konnten nur die Proben der an der Medizinischen Kleintierklinik München untersuchten Hunde zur Messung heran gezogen werden. Aus den Hunden der Kontrollgruppe, wurde eine altersentsprechende Untergruppe aus 16 Hunden gebildet und als Vergleichsgruppe heran gezogen. Die Bestimmung der 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel erfolgte in einem kommerziellen Labor (Biocontrol, Ingelheim, Deutschland) mit Hilfe eines Lumineszenz-Assays.

## **2.4. 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Bestimmung**

Aus dem tiefgefrorenen (-20 °C) Serum von 25 Hunden mit D. m. wurden die 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D-Spiegel bestimmt. 18 gesunde Hunde wurden als Kontrollen heran gezogen. Die Bestimmung wurde in einem kommerziellen Labor (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland) mit Hilfe eines Radio-Rezeptor-Assays durchgeführt.

## **2.5. Sequenzierung der Kandidatengene**

Die Sequenzen der Gene des Vitamin-D-Rezeptors (VDR, accession number NC\_006609), des Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA4, accession number NC\_006619) und der Lymphoid Tyrosin Phosphatase 22, non-receptor-type (LYP-PNP, accession number NC\_006599) wurden aus der öffentlich zugänglichen Datenbank Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) kopiert. Primer für die Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) und die anschließende Sequenzierung der

codierenden Bereiche und der Exon-Intron-Grenzen wurden mit dem Programm Lasergene Primer Select v7.1 (DNASTAR Inc., Madison, USA) erstellt. Für die Sequenzierung des DQA1-Locus des Gens des Dog Leukocyte Antigen (DLA, accession number NC\_006594) wurden bereits etablierte Primer verwendet (KENNEDY et al., 1999).

Die als Primer für die PCR und die Sequenzierung benutzten Oligonukleotide und die Längen der erhaltenen Produkte sowie die entsprechenden Annealingtemperaturen und die Anzahl der PCR-Zyklen sind in Tab. 5 aufgelistet. Die Sequenzierung wurde bei jeweils 20 gesunden Hunden und 20 Hunden mit D. m. verschiedener Rassen in einem kommerziellen Labor durchgeführt (SeqLab GmbH, Göttingen, Deutschland).

Die Primer wurden lyophilisiert geliefert (Operon Biotechnologies GmbH, Köln, Deutschland) und mit TE-Lösung auf eine Konzentration von 100  $\mu\text{Mol}$  resuspendiert. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{Mol}$  verwendet.

Tab.5 Primer, Produktlängen, Annealingtemperatur ( $T_{\text{ann.}}$ ), Zahl der PCR-Zyklen (Zy.)

| Gen   | Region     | Vorwärtsprimer                   | Rückwärtsprimer                   | Länge   | $T_{\text{ann.}}$ | Zy. |
|-------|------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------|-------------------|-----|
| CTLA4 | Exon 1     | CTTAGCAGCTTT<br>GGAGATGTG        | CCGAGCTAGGA<br>GACTGGAG           | 692 bp  | 55 °C             | 35  |
| CTLA4 | Exon 2-3   | GCTGGAGATTTT<br>GCTTGAG          | GCGTTCTTTACC<br>ACTGTCCTT         | 1151 bp | 55 °C             | 35  |
| CTLA4 | Exon 4     | TATAAAAGCTA<br>AATCAAGAAAA<br>TC | TTAAAAGCAAC<br>CTCAAAGACAA<br>T   | 1425 bp | 55 °C             | 35  |
|       |            |                                  |                                   |         |                   |     |
| VDR   | 5' UTR     | GACAGTCCCAG<br>CAGAAGTAATA<br>GG | GCAAAGCCGAG<br>GTCCAG             | 826 bp  | 59 °C             | 35  |
| VDR   | Exon 1     | GCCTGTGAACC<br>CAAACCCTACC<br>AT | TTCACCTCTGCCC<br>TCAAAGCCACT<br>G | 1342 bp | 62 °C             | 35  |
| VDR   | Exon 2     | GGGCCCCACGT<br>CCTCTGT           | CTCTCCATCACT<br>CCTGCCCTTCC       | 676 bp  | 63 °C             | 35  |
| VDR   | Exon 3-4   | GAGGGTGGAGG<br>GTGAGGGGATT<br>GG | AGGGGGCCGGG<br>TAGGGACTCTG<br>G   | 843 bp  | 63 °C             | 30  |
| VDR   | Exon 5     | TTCCCTGCACTT<br>ACAAACACTGG      | GACCTTGGCTCT<br>GACACATACTG<br>G  | 872 bp  | 57 °C             | 35  |
| VDR   | Exon 6-7   | GGGCGTCCTCA<br>GGCTCTTCTTG       | CTATTGCTCACT<br>CCGCCCTCCAG       | 865 bp  | 63 °C             | 30  |
| VDR   | Exon 8     | CAGGTGAGACA<br>TGGGGCTTGAT       | TGGTGTTAGGTT<br>GGGCAGGAGAC       | 646 bp  | 65 °C             | 35  |
|       |            |                                  |                                   |         |                   |     |
| LYP   | Exon 1     | GCCTTCTGCCTT<br>TTCTCTA          | AGCTTCTGGTTT<br>TGCCTCTC          | 623 bp  | 55 °C             | 35  |
| LYP   | Exon 2-5   | TGTTTGGGCAG<br>AAGAGAT           | AAATGGGCAAA<br>AGGAGTT            | 1421 bp | 55 °C             | 35  |
| LYP   | Exon 12-13 | TAAAGTTACCCC<br>CAAAGACATT       | AGAAAGACAAG<br>GAGGAGACTGA<br>GA  | 1385 bp | 57 °C             | 35  |
| LYP   | Exon 14-15 | AATTTATTTTGC<br>TTTCCCTTGAG      | TATCCATCTTTT<br>TACCCACATC<br>C   | 359 bp  | 57 °C             | 35  |
| LYP   | Exon 16-17 | TGTTGGATTGTT<br>TTTTTGTTTCT      | TAGGGGAGGCA<br>GGGAGTGT           | 386 bp  | 57 °C             | 35  |
|       |            |                                  |                                   |         |                   |     |
| DLA   | DQA1       | TAAAGTTCTTTT<br>TCCCTCT          | TGACAGATTCA<br>TGAAGAGA           | 246 bp  | 50 °C             | 35  |
| DLA   | DRB1       | TGGTCCCCACA<br>GCACATTTC         | TGTGTCACACA<br>CTCAGCACCA         | 270 bp  | 50 °C             | 35  |
| DLA   | DQB1       | TCACTGGCCCG<br>CTGTCTCC          | TGTGCGCTCAC<br>CTCGCCGCT          | 267 bp  | 51 °C             | 35  |

### 2.5.1. Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurde in 0,5 ml-Cups durchgeführt, mit einem Reaktionsvolumen von 50  $\mu$ l. Zu 20  $\mu$ l PCR- $H_2O$  (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) wurden je 2  $\mu$ l Vorwärts- und Rückwärtsprimer (jeweils 10  $\mu$ M) sowie 25  $\mu$ l 2x HotStarTaq® Mastermix (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) pipettiert, zum Schluß wurde 1  $\mu$ l der DNA-Lösung eingesetzt; dies entsprach je nach Konzentration der DNA-Lösung 100-5000 ng DNA. Es wurde eine „Hot-Start“-Polymerase verwendet, so dass vor der eigentlichen PCR ein Aktivierungsschritt von 15 min bei 95 °C nötig war. Dem Denaturieren der DNA bei 95 °C folgte ein Annealingschritt mit der in Tab. 5 angegebenen Temperatur und ein Syntheseschritt bei 72 °C. Die entsprechende Temperatur wurde bei jedem Schritt dieses Zyklus eine Minute lang gehalten. Nachdem die in Tab. 5 angegebene Anzahl der Zyklen durchlaufen war, folgte ein Elongationsschritt bei 72 °C für zehn Minuten. Die PCR wurde mit einem T3 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. 10  $\mu$ l jedes PCR-Produkts wurden mit einem Farbstoff (6x Loading Dye, Promega, Madison, USA) gemischt und in ein 1 %iges TBE-Agarose-Gel mit 20  $\mu$ g Ethidiumbromid (GIBCO BRL, Paisley, Großbritannien) pro 100 ml Gel geladen. In einer mit TBE-Puffer gefüllten Gelkammer wurden für ca. 35 min 80 Volt Spannung angelegt; das Gel wurde anschließend unter UV-Licht ausgewertet. Das PCR-Programm und der Reaktionsansatz sind in Tab. 6 angegeben.

Tab. 6 PCR-Programm und Reaktionsansatz

|   |                              |              |            |
|---|------------------------------|--------------|------------|
| <b>PCR-Programm</b>                     | Hot Start                    | 95 °C        | 15 min     |
|   | Denaturierung                | 95 °C        | 1 min      |
|   | Annealing                    | siehe Tab. 5 | 1 min      |
|   | Synthese                     | 72 °C        | 1 min      |
| <b>Ansatz<br/>(50<math>\mu</math>l)</b> | $H_2O$                       |              | 20 $\mu$ l |
|   | Vorwärtsprimer (10 $\mu$ M)  |              | 2 $\mu$ l  |
|   | Rückwärtsprimer (10 $\mu$ M) |              | 2 $\mu$ l  |
|   | Mastermix (2x)               |              | 25 $\mu$ l |
|   | DNA-Template                 |              | 1 $\mu$ l  |

### 2.5.2. Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden mit einem kommerziell erhältlichen Kit aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland). 5  $\mu$ l jedes zur Sequenzierung bestimmten PCR-Produkts wurden mit 2  $\mu$ l des

entsprechenden Primers (Vorwärts- oder Rückwärtsprimer, siehe Tab. 5) vermischt und per Post an das Sequenzierungslabor (SeqLab GmbH, Göttingen, Deutschland) geschickt.

## **2.6. Auffinden von Single Nucleotide Polymorphisms**

Ein Single Nucleotide Polymorphism (SNP) ist ein Austausch einer einzelnen Base im Genom, der im Gegensatz zu einer Mutation keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des entsprechenden Transkripts haben muss. SNPs können im Genom als Marker für Krankheiten und zur Bestimmung von Verwandtschaftsverhältnissen dienen (GRAY et al., 2000). Wenn beide Allele eines Individuums die gleiche Sequenz zeigen, bezeichnet man den Träger als homozygot, wenn ein Allel verändert ist, wird dies als heterozygot bezeichnet.

Die erhaltenen Sequenzen aller Regionen in den Kandidatengenomen wurden abgeglichen und mit dem Programm Lasergene MegAlign v7.1 (DNASTAR Inc., Madison, USA) auf Unterschiede in ihrer Sequenz (SNPs) untersucht. Die erhaltenen SNPs wurden mit V für VDR, C für CTLA4 und L für LYP bezeichnet. Zur Unterscheidung innerhalb der Genregionen wurden ein- bis zweistellige Nummern vergeben.

## **2.7. Genotypisierung aller Individuen**

Die bei der Sequenzierung der Kandidatengene bei 40 Hunden entdeckten SNPs wurden mit drei verschiedene Methoden der SNP-PCR untersucht. Die Genotypisierung mittels SNP-PCR beruht auf der allelspezifischen Vervielfältigung von Genabschnitten, d. h., entweder einer der Primer oder eine Sonde zur Detektion der Mutation müssen spezifisch an eine kurze Sequenz in der DNA binden, die sich nur in einem Nukleotid unterscheidet. Da im DLA-DQA1-Locus auf einer Länge von ca. 300 Basenpaaren elf SNPs gefunden werden konnten, wurde hier die Sequenzierung dieses Locus als effektivste Methode zur Genotypisierung aller Hunde angesehen und entsprechend bei allen Hunden in einem kommerziellen Labor (SeqLab GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

### **2.7.1. Amplification Refractory Mutation System-PCR**

Bei der Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR werden zwei verschiedene, allelspezifische Primer zur Detektion der Mutation verwendet, die unter sehr stringenten PCR-Bedingungen nur an jeweils eins der fraglichen Allele binden. Die Primer bestehen aus einem Oligonukleotid, das komplementär an die zu untersuchende Sequenz bindet, mit ihrem 3'-Ende an der Stelle des SNP. Um

die Spezifität der Bindung zu erhöhen, wird an der vorletzten Base (vor der Mutation) eine Fehlbasenpaarung eingeführt. Damit wird die Bindungsstärke vermindert, und nur der Primer, der tatsächlich komplementär zur Sequenz ist, kann an die DNA gebunden werden und nur diese komplementäre DNA wird amplifiziert.

Der Nachweis der Bindung funktioniert nach dem sogenannten TaqMan-Prinzip, d. h. eine Sonde, die ebenfalls aus einem Oligonukleotid besteht und zwischen dem Primerpaar an die DNA bindet, trägt an ihrem 5'-Ende und an ihrem 3'-Ende einen Reporter- bzw. Quencherfarbstoff. Unter Anregung durch einen Argon-Laser emittiert der Reporterfarbstoff Energie, die auf den in der Nähe befindlichen Quencherfarbstoff übertragen wird. Dieser gibt diese Energie entweder in Form von Licht anderer Wellenlänge oder von Wärmeenergie ab. Im vorliegenden Assay wird ein „black hole quencher“ verwendet, so dass keine Lichtemission zu messen ist, so lange Reporter- und Quencherfarbstoff an der Sonde binden. Die Taq-Polymerase synthetisiert nun von den Primern ausgehend einen komplementären DNA-Strang zu dem bereits vorliegenden Strang mit der gebundenen Sonde, bis die Taq-Polymerase auf die Sonde trifft. Durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase werden Reporter- und Quencherfarbstoff während der DNA-Synthese von der Sonde abgespalten und so räumlich getrennt, so dass nun die Energie des angeregten Reporterfarbstoffes nicht mehr auf den Quencherfarbstoff übertragen und von diesem in Wärme umgewandelt werden kann, sondern als Fluoreszenz abgegeben wird, die mit einem Detektor messbar ist. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zur Anzahl der vorliegenden Amplifikate mit dem jeweils zum Primer komplementären Nukleotid, während die DNA mit dem nicht dem Primer entsprechenden Allel nicht vervielfältigt wird.

Pro SNP müssen deshalb drei Primer konstruiert werden, zwei, die zu den beiden möglichen Allelen komplementär sind, und ein gemeinsamer Rückwärtsprimer. Pro Hund sind zwei Ansätze mit der gleichen Menge DNA und je einem allelspezifischen Primer nötig. Kann in beiden Ansätzen eine entsprechende Amplifikation der DNA beobachtet werden, ist das Individuum für diesen SNP heterozygot, d. h. beide Allele sind vorhanden. Bei Amplifikation der DNA in nur einem Ansatz ist das Individuum homozygot für das jeweils amplifizierte Allel (STEINBORN et al., 1998).



Die PCR wurde hier als real-time quantitative PCR durchgeführt, d. h. die Fluoreszenz wurde nach jedem Amplifikationszyklus gemessen. Die verwendeten Sonden, Primer und die Annealingtemperatur sowie das PCR-Programm und die Konzentrationen der verwendeten Reagenzien sind in Tab. 7 angegeben. Für SNP V7 und SNP V8 sowie für SNP V10 und SNP V11 wurde jeweils dieselbe Sonde verwendet.

Die PCR wurde auf einem Mastercycler EP realplex (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) in 96-Loch Mikrotiterplatten (Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich) durchgeführt. Es wurden für jede DNA-Probe zwei Ansätze mit je 10 µl Mastermix, bestehend aus  $MgCl_2$  (Solis Biodyne, Tartu, Estland), allelspezifischem Vorwärts- und gemeinsamem Rückwärtsprimer (Invitrogen GmbH, Lofer, Österreich), DNA-Sonde, markiert mit dem Fluoreszenzreporterfarbstoff FAM und dem Quencherfarbstoff BHQ1 (Metabion, Martinsried, Deutschland), SmartTaq-Polymerase (Medigen, Nowosibirsk, Russland), dNTP-Mix, 10x Buffer BD (Solis Biodyne, Tartu, Estland) sowie Reinstwasser auf Eis vorgelegt und je 5 µl DNA jedes Individuums dazu pipettiert. Nach 45 PCR-Zyklen wurde der Cycle Threshold ( $C_t$ -)Wert für alle Proben berechnet.

Der  $C_t$ -Wert gibt an, ab welchem Zyklus die Fluoreszenz signifikant größer ist als die Hintergrundfluoreszenz. Er ist als das Zehnfache der Standardabweichung der mittleren Fluoreszenz definiert und markiert den Beginn der exponentiellen und damit spezifischen Vervielfältigungsphase der DNA. Da die Primer nicht vollkommen spezifisch an die komplementäre DNA binden, sondern in viel geringerem Maße auch eine unspezifische Amplifikation zeigen, sollte auch der nicht-komplementäre Primer ein zweites Signal nach deutlich mehr Zyklen zeigen. Dadurch kann kontrolliert werden, ob auch tatsächlich in beiden Ansätzen Primer und Sonden korrekt pipettiert wurden. Leider konnte diese Positivkontrolle nicht bei allen SNPs durchgeführt werden, da die Effizienz der Ansätze zum Teil nicht ausreichend war, um nach 45 Zyklen eine unspezifische Amplifikation zu erhalten. Durch das Mitführen von DNA bekannter Sequenz und das Verwenden eines elektronischen Handdispensers wurde jedoch das Risiko unbemerkter Pipettierfehler vermindert.

Ein Unterschied von mehr als sechs Zyklen ( $\Delta C_t > 6$ ) wurde als spezifische Amplifikation in nur einem Ansatz und damit als homozygot definiert. Bei einer Effizienz von 100 % entspräche ein  $\Delta C_t$  von 6 einer  $2^6$ -fachen Menge des

Amplifikats. Da die Bindungseffizienz der Primer unterschiedlich war, unterschieden sich die  $C_t$ -Werte trotz gleicher DNA-Menge bei den unterschiedlichen Allelen, deswegen wurde ein  $\Delta C_t < 4$  als Amplifikation in beiden Ansätzen und damit als heterozygot definiert. Proben, deren  $\Delta C_t$ -Wert zwischen vier und sechs lag wurden erneut genotypisiert. Wenn die zweite Genotypisierung ebenfalls ohne eindeutiges Ergebnis blieb, wurde die Probe aus der Studie ausgeschlossen.

Die Primer und Sonden wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Ralf Steinborn vom Institut für molekulare Tierzucht und Genetik der VU Wien zur Verfügung gestellt, an dessen Institut auch die Genotypisierung mittels ARMS-PCR durchgeführt wurde.

Tab.7 ARMS-PCR, Primer und Sonden (T<sub>a</sub>= Annealingtemperatur in °C)

| SNP                         | Oligonukleotidsequenz                           |  | T <sub>a</sub> |         |
|-----------------------------|---|--|----------------|---------|
| V7                          | allelspez. Primer 1 <i>rev</i>                  | CCTCACTAATGATCAAATGACTCT               | 57             |         |
|                             | allelspez. Primer 2 <i>rev</i>                  | CCTCACTAATGATCAAATGACTCC               |                |         |
|                             | gemeins. Primer <i>forw</i>                     | GCACAAATTTATGCTTCGTTTAGC               |                |         |
| V8                          | allelspez. Primer 1 <i>rev</i>                  | CCAGAGATACTCCAAGAAATGTA                | 58             |         |
|                             | allelspez. Primer 2 <i>rev</i>                  | CCAGAGATACTCCAAGAAATGTG                |                |         |
|                             | gemeins. Primer <i>for</i>                      | GCACAAATTTATGCTTCGTTTAGC               |                |         |
|                             | Sonde V6/V7: FAM-TTAGGCAACCCTTGTGCCATGCG-BHQ1   |  |                |         |
| V10                         | allelspez. Primer 1 <i>for</i>                  | GAGGGAAGAAGACTCAGATGT                  | 55             |         |
|                             | allelspez. Primer 2 <i>for</i>                  | GAGGGAAGAAGACTCAGATGTC                 |                |         |
|                             | gemeins. Primer <i>rev</i>                      | TGGGCTGTACTTCTCAGACATTG                |                |         |
| V11                         | allelspez. Primer 1 <i>for</i>                  | TACAGCATCCAAAAGGTCAAT                  | 56             |         |
|                             | allelspez. Primer 2 <i>for</i>                  | TACAGCATCCAAAAGGTCAAC                  |                |         |
|                             | gemeins. Primer <i>rev</i>                      | TGGGCTGTACTTCTCAGACATTG                |                |         |
|                             | Sonde V8/V9: FAM-CCAGACCCTACCCCAGACCGCCTAC-BHQ1 |  |                |         |
| V13                         | allelspez. Primer 1 <i>for</i>                  | CCTGTCTCCCTGTGCTAG                     | 58             |         |
|                             | allelspez. Primer 2 <i>for</i>                  | CCTGTCTCCCTGTGCTAA                     |                |         |
|                             | gemeins. Primer <i>rev</i>                      | AGCGGATGTAGGTCTGCAGTGT                 |                |         |
|                             | Sonde: FAM-CCCTCCAAGACCGCCTGTCCAACA-BHQ1        |  |                |         |
| C2                          | allelspez. Primer 1 <i>rev</i>                  | ATATTGCTCCCAAGTGATACTTTTTT             | 57             |         |
|                             | allelspez. Primer 2 <i>rev</i>                  | ATATTGCTCCCAAGTGATACTTTTTC             |                |         |
|                             | gemeins. Primer <i>for</i>                      | CAGAGCCAGGATGTTTCTGTCAC                |                |         |
|                             | Sonde: FAM-CCTTTGCTTTCTTTGGACCGCACCA-BHQ1       |  |                |         |
| PCR-Programm<br>(45 Zyklen) |   | Hot Start                              | 95 °C          | 5 min   |
|                             |   | Denaturierung<br>Annealing<br>Synthese | 95 °C          | 15 sec  |
|                             |   |  | 55 – 58 °C     | 25 sec  |
|                             |   |  |                | 60 °C   |
| Ansatz<br>(15 µl)           |   | 25 mM MgCl                             |                | 2,70 µl |
|                             |   | gemeins. Primer (10 pMol/µl)           |                | 0,45 µl |
|                             |   | allelspez. Primer (10 pMol/µl)         |                | 0,15 µl |
|                             |   | DNA-Sonde (10 pMol/µl)                 |                | 0,15µl  |
|                             |   | SmartTaq (5 U/µl)                      |                | 0,18 µl |
|                             |   | dNTP-Mix (2 mM pro dNTP)               |                | 1,50 µl |
|                             |   | 10 x Buffer BD                         |                | 1,50 µl |
|                             |   | Reinstwasser                           |                | 3,37 µl |
|                             |   | DNA-Template                           |                | 5,00 µl |

### 2.7.2. Primer-Probe-Assay

Auch beim Primer-Probe-Assay wird die Genotypisierung durch komplementäre DNA-Sonden nach dem TaqMan-Prinzip vorgenommen. Hier sind jedoch nicht die Primer, sondern die Sonden allelspezifisch. Die für jedes Allel spezifische Sonde wird durch unterschiedliche fluoreszierende Farbstoffe gekennzeichnet, so dass pro SNP nur ein Ansatz notwendig ist.

Die Messung der Fluoreszenz erfolgt nicht kontinuierlich während der PCR, sondern in einem zusätzlichen Messschritt am Ende der Reaktion. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in einem Diagramm, in dem die bei den verschiedenen Wellenlängen der beiden Farbstoffe gemessene Fluoreszenz gegeneinander aufgetragen wird. Homozygote Proben für beide Allele sowie heterozygote Proben gruppieren sich in drei verschiedene Punktwolken, die manuell anhand mitgeführter Proben bekannter Sequenz dem jeweiligen Genotyp zugeordnet werden (PARKER et al., 2006).

Für drei der SNPs wurde ein kommerzieller Assay-by-Design-Service (Applied Biosystems, Foster City, USA) genutzt, der sowohl Primer- und Sondendesign als auch Herstellung eines fertigen Assaymixes mit Primern und Sonden in der richtigen Konzentration übernahm. In eine 96-Loch-Platte (Thermowell® Gold PCR Plates, Corning Inc., Corning, USA) wurden 12,5 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA), 0,625 µl Assay Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) und 11,8 µl DNA (1:30 verdünnt) pipettiert. Nach einer Aktivierung bei 95 °C (15 min) wurden 40 Zyklen eines Zwei-Schritt-PCR-Programms mit einem AB 7300-Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt, mit 15 sec Denaturierung bei 92 °C sowie 60 sec Annealing/Extension bei 60 °C. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenz bei 60 °C. Sequenzen der Primer und der Sonden sind in Tab.8 angegeben.

Tab. 8 Primer-Probe-Assay; Primer, Sonden, PCR-Programm und Reaktionsansatz (SNP = Single Nucleotide Polymorphism, VIC, FAM = Fluoreszenzfarbstoffe), fettgedruckt: Basenaustausch

| SNP   |                |                                 |              |
|---|----------------|---------------------------------|--------------|
| C1  | Primer forward | GTTGGCCTTCCTGGATGATTCTA         |              |
|   | Primer reverse | CCCTTGGATGGTGAGGTTCA            |              |
|   | Sonde VIC      | CCTGCACCGGCACC                  |              |
|   | Sonde FAM      | CCTGCACTGGCACC                  |              |
| V1  | Primer forward | CGAGCTTCGGGCACATG               |              |
|   | Primer reverse | CGCTGGAGTCAGTGCCA               |              |
|   | Sonde VIC      | CTGGCTAACATCCTT                 |              |
|   | Sonde FAM      | TGGCTAGCATCCTT                  |              |
| L1  | Primer forward | CCTCTTCAGAAGCATCAAAGTTTGG       |              |
|   | Primer reverse | GCTACATCTGCAGGTTTAGAATTTGG      |              |
|   | Sonde VIC      | CTGGCTAACATCCTT                 |              |
|   | Sonde FAM      | TGGCTAGCATCCTT                  |              |
| <b>PCR-Programm<br/>(40 Zyklen + Messschritt)</b> |                | Hot Start                       | 95 °C 15 min |
|   |                | Denaturierung                   | 92 °C 15 sec |
|   |                | Annealing/Synthese              | 60 °C 60 sec |
| <b>Ansatz<br/>(25 µl)</b>                         |                | TaqMan®Universal PCR Master Mix | 12,5 µl      |
|   |                | Assay Mix                       | 0,625 µl     |
|   |                | DNA-Template                    | 11,8 µl      |

### 2.7.3. Meltingcurve-PCR

Bei der Meltingcurve-PCR findet die Diskriminierung der verschiedenen Allele durch unterschiedlich lange, allelspezifische Primer statt. Eine Sonde ist nicht notwendig, und statt des Reporter- und Quencherfarbstoffes wird nur ein Fluoreszenzfarbstoff zugegeben, der mit doppelsträngiger DNA unspezifisch reagiert.

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I interkaliert unter Zunahme seiner Fluoreszenz mit doppelsträngiger DNA. Wenn bei einem kontinuierlichen Ansteigen der Temperatur immer mehr DNA-Doppelstränge dissoziieren, führt dies zu einer Fluoreszenzabnahme. Jedes PCR-Produkt hat eine charakteristische Schmelztemperatur, die mit steigender Länge zunimmt und die über einen Höhepunkt in der negativen ersten Ableitung der Fluoreszenzkurve bestimmt werden kann.

Neben einem gemeinsamen Rückwärtsprimer (optimale Länge 15 - 22 bp) für beide Allele wird je ein allelspezifischer Vorwärtsprimer (optimale Länge 22 - 27 bp) verwendet, der mit dem 3'-Ende am SNP bindet. Die beiden Primer sollten nicht mehr als 20 bp auseinander liegen und keine Sekundärstrukturen oder

Primerdimere bilden. An das 5'-Ende des allelspezifischen Primers, der am 3'-Ende das Nukleotid mit der höheren Schmelztemperatur hat (d. h. G/C im Vergleich zu A/T) wird ein GC-Tail von 14 bp Länge angehängt (5'-GCGGGCAGGGCGGC-3'), an den anderen Primer ein GC-Tail von 6 bp Länge (5'-GCGGGC-3'). Dies führt zu unterschiedlich langen Amplikons, die sich deutlich ( $> 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in ihrer Schmelztemperatur unterscheiden sollten. In mehreren Vorversuchen muss die optimale Annealingtemperatur bestimmt sowie die Konzentration der allelspezifischen Primer optimiert werden (LINDBLAD-TOH et al., 2005). Nur für einen der SNPs konnte ein funktionierender Ansatz etabliert werden; die Primer und Reaktionsbedingungen sind in Tab. 9 angegeben.

Die PCR wurde auf 96-Loch-Platten (Thermowell® Gold PCR Plates, Corning Inc., Corning, USA) mit einem AB 7300-Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Im Anschluss an die PCR folgte ein Dissoziationsschritt, in dem mittels eines Temperaturgradienten (60 - 95 °C) die Schmelztemperatur der PCR-Produkte bestimmt wurde. Entweder zeigte die negative erste Ableitung der Fluoreszenzkurve einen Peak bei der niedrigeren Schmelztemperatur, dann wurde das kürzere Amplikon amplifiziert und die Probe enthielt Adenin oder Thymin an der Stelle des SNPs, oder es zeigte sich ein Peak mit einer höheren Temperatur, dann war die Probe homozygot für Guanin oder Cytosin. Heterozygote Tiere wiesen zwei Peaks auf, je einen Peak bei der entsprechenden Temperatur. Die Primer wurden von der Operon Biotechnologies GmbH in Köln, Deutschland bezogen. Es wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Um diese neue Genotypisierungsmethode mit der ARMS-PCR vergleichen zu können, wurde SNP V7 mittels beider Methoden genotypisiert.

Tab. 9 SNP V7 Meltingcurve-PCR; Primer, PCR-Programm, Reaktionsansatz, fettgedruckt: Basenaustausch

|  |                                |        |        |
|--|--------------------------------|--------|--------|
| <b>Primer 1 (allelspezifisch)</b>                            | GCGGGCAGGGCGGCCCTGGCTAGCCCTGAC |        |        |
| <b>Primer 2 (allelspezifisch)</b>                            | GCGGGCCCTGGCTAGCCCTGAT         |        |        |
| <b>gemeinsamer Primer</b>                                    | AGTCAGGTGCCCTCCTCCTTGG         |        |        |
| <b>PCR-Programm<br/>(40 Zyklen +<br/>Dissociation Stage)</b> | Hot Start                      | 95 °C  | 10 min |
|  | Denaturierung                  | 95 °C  | 20 sec |
|  | Annealing                      | 60 °C  | 60 sec |
|  | Synthese                       | 72 °C  | 30 sec |
| <b>Ansatz<br/>(20 µl)</b>                                    | H <sub>2</sub> O               | 7,8 µl |        |
|  | Primer 1 (10 µM)               | 0,4 µl |        |
|  | Primer 2 (5 µM)                | 0,4 µl |        |
|  | gemeinsamer Primer (10 µM)     | 0,4 µl |        |
|  | 2x SYBR-Green Mastermix        | 10 µl  |        |
|  | DNA-Template                   | 1 µl   |        |

## 2.8. Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS für Windows, Version 13.01 (SPSS Inc., Chicago, USA) vorgenommen. Für den Vergleich der Vitamin-D-Mittelwerte wurde der ungepaarte Student's t-Test heran gezogen, für den Vergleich der Allelfrequenzen der  $\chi^2$ -Test. Ein  $p$  von  $\leq 0,05$  galt als signifikant. Die Analyse der Teststärke und der benötigten Tierzahl wurde mit Power And Precision™ (Biostat Inc., Englewood, USA) durchgeführt.

## IV. Ergebnisse

### 1. Sequenzierung

Es wurden insgesamt für 18 Abschnitte der Gene des VDR, CTLA4, LYP-PNP und DLA Primerpaare erstellt, die Abschnitte mittels PCR amplifiziert und die aufgereinigte, vervielfältigte DNA sequenziert. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass möglichst viele Anteile möglichst aller Exons und der Exon-Intron-Grenzen amplifiziert wurden.

#### 1.1. Sequenzierung Vitamin-D-Rezeptor-Gen

Beim Vergleich der sequenzierten Genabschnitte wurden sieben SNPs im Gen des VDR festgestellt, davon drei in Introns, drei in Exons sowie einer in der untranslatierten 5'-Region (Abb. 1).

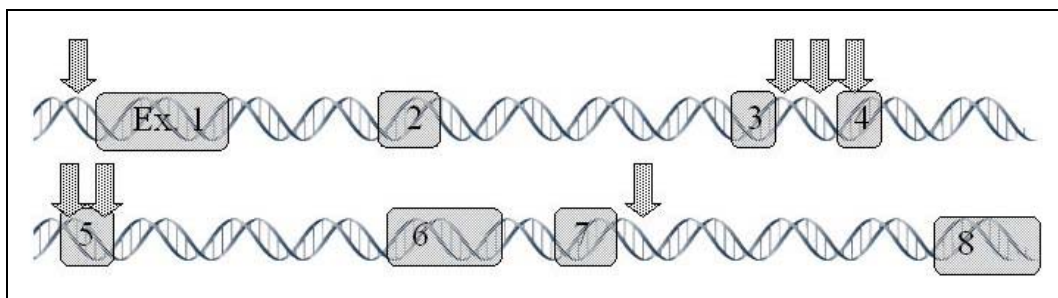


Abb. 1: Single Nucleotide Polymorphisms (Pfeile) im Vitamin-D-Rezeptor-Gen (codierende Bereiche (Exons) durch graue Kästchen dargestellt)

#### 1.2. Sequenzierung Cytotoxic-T-Lymphocyte-Antigen-4-Gen

Im CTLA4-Gen wurden zwei SNPs festgestellt, davon einer in Exon 2 und einer in Exon 4 (Abb. 2).

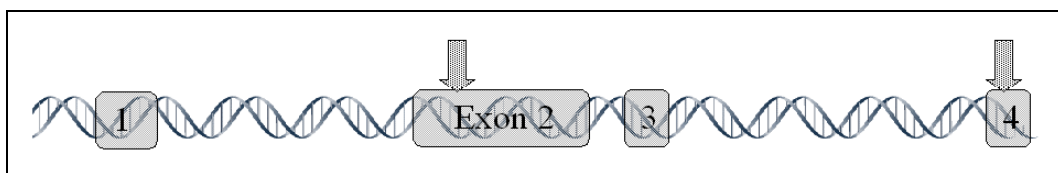


Abb. 2: Single Nucleotide Polymorphisms (Pfeile) im Cytotoxic-T-Lymphocyte-Antigen-4-Gen (codierende Bereiche (Exons) durch graue Kästchen dargestellt)



### 1.3. Sequenzierung Lymphoid-Tyrosin-Phosphatase-Gen

Im LYP-Gen wurde ein SNP festgestellt, er befand sich in Exon 13 und hatte einen Aminosäurenaustausch (Phenylalanin > Leucin) zur Folge.

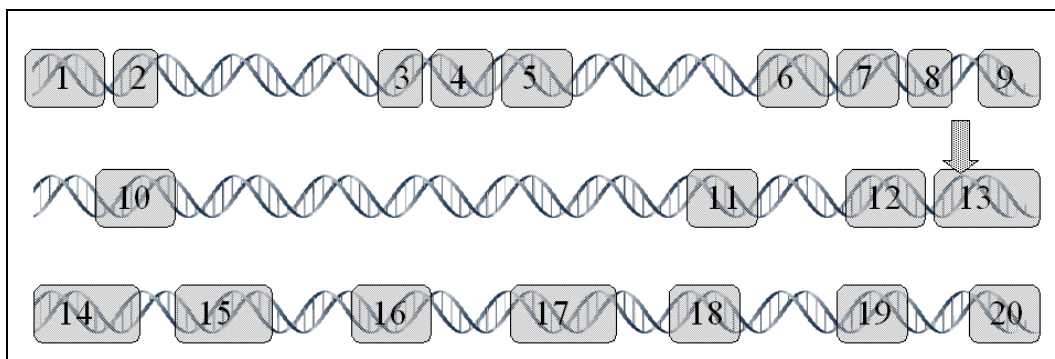


Abb. 3: Single Nucleotide Polymorphisms (Pfeile) im Lymphoid-Tyrosin-Phosphatase-Gen (codierende Bereiche (Exons) durch graue Kästchen dargestellt)

Alle SNPs mit der genauen Lokalisation und der Benennung gemäß der Nomenklatur der Human Genome Variation Society (HGVS) sind in Tab. 10 aufgelistet.

Tab. 10 Lokalisation der Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) (UTR = Untranslated Region, AS-Aust. = Aminosäurenaustausch, PPA = Primer-Probe-Assay, ARMS = Amplicon Mutation Refractory System-PCR, TM = Meltingcurve-PCR, Phe = Phenylalanin, Leu = Leucin)

| SNP                | Region   | Gen     | AS-Aust.  | PCR         |
|--------------------|----------|---------|-----------|-------------|
| V1 c.-21T>C        | 5' UTR   | VDR     | -         | PPA         |
| V7 c.501+ 3310A>G  | Intron 3 | VDR     | -         | ARMS/TM     |
| V8 c.501+3434C>T   | Intron 3 | VDR     | -         | ARMS        |
| V9 c.533C>T        | Exon 4   | VDR     | -         | sequenziert |
| V10 c.677T>C       | Exon 5   | VDR     | -         | ARMS        |
| V11 c.761T>C       | Exon 5   | VDR     | -         | ARMS        |
| V13 c.1150+1580A>G | Intron 7 | VDR     | -         | ARMS        |
| C1 c.372C>T        | Exon 2   | CTLA4   | -         | PPA         |
| C2 c.958A>G        | Exon 4   | CTLA4   | -         | ARMS        |
| LYP c.2344A>T      | Exon 13  | LYP-PNP | Phe > Leu | PPA         |

#### 1.4. Sequenzierung Dog Leukozyte Antigen DQA1-Locus

Im 246 bp langen DQA1-Locus des DLA-Gens konnten elf SNPs beim Vergleich der Gensequenzen bestimmt werden. Eine bestimmte Kombination dieser SNPs wird als Haplotyp bezeichnet, deren Nomenklatur im Falle des DLA-Gens von der International Society for Animal Genetics (ISAG) festgelegt wird (KENNEDY et al., 2001). Diese Nomenklatur sowie die sechs bisher nicht beschriebenen Haplotypen sind in Tab. 12 dargestellt. Um Sequenzierfehler auszuschließen, wurden alle sechs bisher nicht beschriebenen Haplotypen sowohl mit dem DLA-DQA1-Vorwärtsprimer als auch mit dem DLA-DQA1-Rückwärtsprimer sequenziert.

Tab. 12 Haplotypen des Dog Leukocyte Antigen DQA1-Locus (ISAG = International Society for Animal Genetics, N = neuer Haplotyp, SNP = Single Nucleotide Polymorphism)

| Bezeichnung<br>nach ISAG | Nukleotid am entsprechenden SNP |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |
|--------------------------|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|
|                          | 1                               | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| DQA1*00101               | A                               | A | G | A | T | T | A | T | A | G  | A  |
| DQA1*00201               | T                               | A | C | A | T | T | A | C | A | G  | C  |
| DQA1*00301               | T                               | A | C | A | C | G | G | C | C | T  | A  |
| DQA1*00401               | T                               | A | C | A | T | T | A | T | C | G  | A  |
| DQA1*005011              | T                               | T | C | A | T | T | A | C | A | G  | A  |
| DQA1*005012              | T                               | T | C | G | T | T | A | C | A | G  | A  |
| DQA1*00601               | T                               | A | G | A | T | T | A | T | C | G  | A  |
| DQA1*00701               | T                               | A | C | A | T | T | A | C | A | G  | C  |
| DQA1*00801               | T                               | A | C | A | C | G | G | C | C | G  | A  |
| DQA1*00901               | T                               | T | G | A | T | T | A | T | A | G  | A  |
| DQA1*01001               | T                               | A | G | A | T | T | G | C | C | T  | A  |
| DQA1*01101               | T                               | A | C | A | T | T | A | T | A | G  | A  |
| DQA1*01201               | T                               | A | C | A | T | T | G | C | A | G  | A  |
| DQA1*01301               | T                               | A | G | A | T | T | A | C | A | G  | A  |
| DQA1*01401               | T                               | A | G | A | T | T | A | T | A | G  | A  |
| DQA1*01501               | A                               | T | G | A | T | T | A | T | A | G  | A  |
| N1                       | T                               | A | C | A | T | T | A | C | C | G  | A  |
| N2                       | T                               | T | C | A | T | T | A | C | C | G  | A  |
| N3                       | T                               | T | C | A | T | T | A | T | C | G  | A  |
| N4                       | T                               | A | C | A | T | T | G | T | C | G  | A  |
| N5                       | T                               | A | C | A | C | T | A | T | C | G  | A  |
| N6                       | T                               | A | C | A | T | T | G | T | C | G  | A  |

## 2. Allelfrequenzen

Die Genotypisierung aller Hunde für diese SNPs ergab die in Tab. 11 aufgelisteten Allelfrequenzen mit den Ergebnissen des  $\chi^2$ -Tests und den entsprechenden  $p$ -Werten. Ein  $\chi^2$ -Wert von 5,99 entsprach bei der hier vorliegenden Kreuztabelle mit zwei Spalten und drei Zeilen (zwei Freiheitsgrade) einem  $p$ -Wert von 0,05. Nur bei SNP V1 war der Unterschied in den Allelfrequenzen zwischen Hunden mit D. m. und gesunden Hunden statistisch signifikant ( $\chi^2 > 5,99$  ;  $p < 0,05$ ); hier trugen 53 % der Hunde mit D. m. das T-Allel, im Vergleich zu 29 % der gesunden Hunde. Dies ergab eine Odds Ratio von 2,71 (95 % Konfidenzintervall  $1,52 < OR < 4,95$ ), damit hatten Hunde der untersuchten Population mit dem T-Allel an SNP V1 ein ca. 2,7 mal höheres Risiko, an D. m. zu erkranken als Träger des C-Allels oder als heterozygote Tiere.

Tab. 11 Allelfrequenzen (f(A)) für alle Hunde (SNP = Single Nucleotide Polymorphism, D. m. = Diabetes mellitus, n = Anzahl der Hunde)

| SNP | F(A) Hunde mit D. m. |        |          | f(A) gesunde Hunde |        |          | $\chi^2$ | $P$    | n   |
|-----|----------------------|--------|----------|--------------------|--------|----------|----------|--------|-----|
| V1  | c 0,16               | t 0,53 | c/t 0,31 | c 0,29             | t 0,29 | c/t 0,41 | 6,95     | < 0,05 | 117 |
| V7  | a 0,57               | g 0,10 | a/g 0,32 | a 0,58             | g 0,17 | a/g 0,24 | 3,12     | > 0,05 | 93  |
| V8  | c 0,54               | t 0,08 | c/t 0,38 | c 0,50             | t 0,24 | c/t 0,26 | 3,68     | > 0,05 | 107 |
| V9  | c 0,50               | t 0,11 | c/t 0,38 | c 0,46             | t 0,26 | c/t 0,26 | 1,68     | > 0,05 | 41  |
| V10 | c 0,08               | t 0,52 | c/t 0,40 | c 0,18             | t 0,45 | c/t 0,37 | 2,42     | > 0,05 | 117 |
| V11 | c 0,08               | t 0,44 | c/t 0,47 | c 0,20             | t 0,44 | c/t 0,36 | 2,79     | > 0,05 | 95  |
| V13 | a 0,02               | g 0,63 | a/g 0,35 | a 0,08             | g 0,60 | a/g 0,32 | 2,27     | > 0,05 | 123 |
| C1  | c 0,26               | t 0,34 | c/t 0,40 | c 0,26             | t 0,31 | c/t 0,43 | 0,26     | > 0,05 | 122 |
| C2  | a 0,14               | g 0,45 | a/g 0,41 | a 0,18             | g 0,40 | a/g 0,42 | 0,45     | > 0,05 | 114 |
| LYP | a 0,00               | t 0,96 | a/t 0,04 | a 0,00             | t 0,97 | a/t 0,03 | 0,19     | > 0,05 | 123 |

## 3. Allelfrequenzen Dog Leukocyte Antigen DQA1-Locus

Jeder Hund wurde anhand der SNPs in der Sequenz des DLA-DQA1-Gens dem entsprechenden oder, im Falle von heterozygoten Individuen, den beiden entsprechenden Haplotypen zugeordnet. Bei eventuellen Doppeldeutigkeiten wurde zuerst die Zuordnung zu allen bekannten Haplotypen versucht, bevor ein bisher unbekannter Haplotyp postuliert wurde. So konnten die Haplotypen aller Individuen eindeutig zugeordnet werden. Die Häufigkeiten der einzelnen Haplotypen (Allelfrequenzen) sind in Tab. 13 sowie in Abb. 1 dargestellt; homozygote Individuen wurden doppelt gezählt, d. h. pro Hund wurden immer zwei Haplotypen angegeben, Prozentwerte wurden nur für Haplotypen mit  $n \geq 20$  angegeben.

Tab. 13 Allelfrequenzen Dog Leukocyte Antigen DQA1 (D. m. = Diabetes mellitus, Kontr. = gesunde Kontrollen), geordnet nach Häufigkeit der Haplotypen

| Haplotypen | gesamt | Anzahl D. m. | % D. m. | Anzahl Kontr. | % Kontr. |
|------------|--------|--------------|---------|---------------|----------|
| DQA1*00601 | 55     | 34           | 61,8    | 21            | 38,2     |
| DQA1*00401 | 54     | 18           | 33,3    | 36            | 66,7     |
| DQA1*00101 | 22     | 14           | 63,6    | 8             | 36,4     |
| DQA1*00501 | 20     | 4            | 20,0    | 16            | 80,0     |
| DQA1*00901 | 13     | 3            |         | 10            |          |
| N1         | 10     | 5            |         | 5             |          |
| DQA1*00301 | 9      | 7            |         | 2             |          |
| DQA1*01101 | 7      | 2            |         | 5             |          |
| DQA1*01401 | 7      | 3            |         | 4             |          |
| N2         | 5      | 4            |         | 1             |          |
| N4         | 3      | 3            |         | 0             |          |
| DQA1*00701 | 3      | 1            |         | 2             |          |
| N6         | 3      | 0            |         | 3             |          |
| DQA1*00801 | 2      | 2            |         | 0             |          |
| N5         | 2      | 2            |         | 0             |          |
| N3         | 1      | 0            |         | 1             |          |

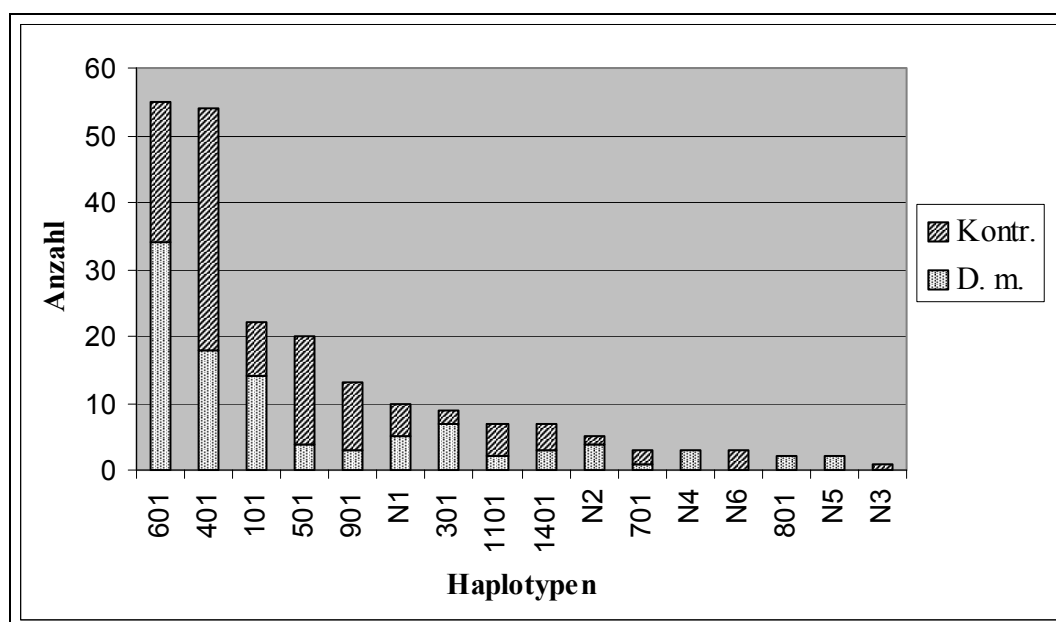


Abb. 4 absolute Häufigkeiten der Haplotypen (D. m. = Diabetes mellitus, Kontr. = gesunde Kontrollgruppe)

Für die Träger der vier häufigsten Haplotypen wurden aus den Anteilen der Hunde mit und ohne D. m. die jeweiligen Odds Ratios (Tab. 14) berechnet, die übrigen Haplotypen waren zu selten, um eine Aussage über ihre Rolle beim D. m. in der untersuchten Population zu treffen. Unter den vier häufigsten Haplotypen kam bei zwei Haplotypen eine Häufung von Hunden mit D. m. vor

(DQA1\*00601, DQA1\*00101), bei zwei Haplotypen waren Hunden mit D. m. seltener anzutreffen (DQA1\*00401, DQA1\*00501). Daraus ergibt sich ein höheres Risiko für Träger der Haplotypen DQA1\*00601 und DQA1\*00101, an D. m. zu erkranken. Die Träger der Haplotypen DQA1\*00401 und DQA1\*00501 hatten ein geringeres Risiko, an D. m. zu erkranken.

Tab. 14 Odds Ratios für die vier häufigsten Haplotypen in der untersuchten Population (KI = Konfidenzintervall, n = absolute Häufigkeit)

| Haplotyp | Odds Ratio | 95 % - KI   | n  |
|----------|------------|-------------|----|
| 601      | 2,20       | 1,10 - 4,80 | 55 |
| 101      | 2,10       | 0,92 - 5,89 | 22 |
| 401      | 0,46       | 0,19 - 0,95 | 54 |
| 501      | 0,25       | 0,05 - 0,72 | 20 |

Ein Basenaustausch an SNP D3 (Guanin > Adenin) führt zu einem Aminosäureaustausch (Arginin > Threonin) an Position 55 des entsprechenden Proteins. 57,8 % der Allele (59/102), die positiv für einen Haplotyp waren, der für Arginin an Position 55 des DLA-DQA1-Proteins kodiert (101, 601, 801, 901, 1401, N4), stammten von Hunden mit D. m. Die Allele, die positiv für Threonin an Position 55 waren, stammten hingegen zu 62,3 % (71/114) von gesunden Hunden. Damit hatten Hunde, die ein Arginin an Position 55 des DLA-DQA1-Proteins trugen, ein 2,26-fach höheres Risiko an D. m. zu erkranken, als Hunde, die an dieser Stelle ein Threonin trugen (OR = 2,26, 95 %-Konfidenzintervall 1,52 - 3,45).

#### 4. Vitamin-D-Spiegel

Bei 29 Hunden (13 mit D. m., 16 gesunde) wurden die 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel bestimmt. Bei 43 Hunden (25 mit D. m., 18 gesunde) wurden die 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel bestimmt.

Ein Unterschied in den Vitamin-D-Spiegeln ergab sich weder bei den 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegeln noch bei den 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegeln im Vergleich der gesunden Hunde mit den Hunden mit D. m.

##### 4.1. Messung der 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel

Der Mittelwert der 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Konzentration lag bei den Hunden mit D. m. bei 20,49 ng/ml (n = 13, Standardabweichung SD = 8,61), bei der Kontrollgruppe bei 22,71 (n = 16, SD = 8,92). Damit unterscheiden sich die

25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel von Hunden mit D. m. nicht von denen gesunder Hunde. In Abb. 5 sind die entsprechenden Boxplots wiedergegeben.

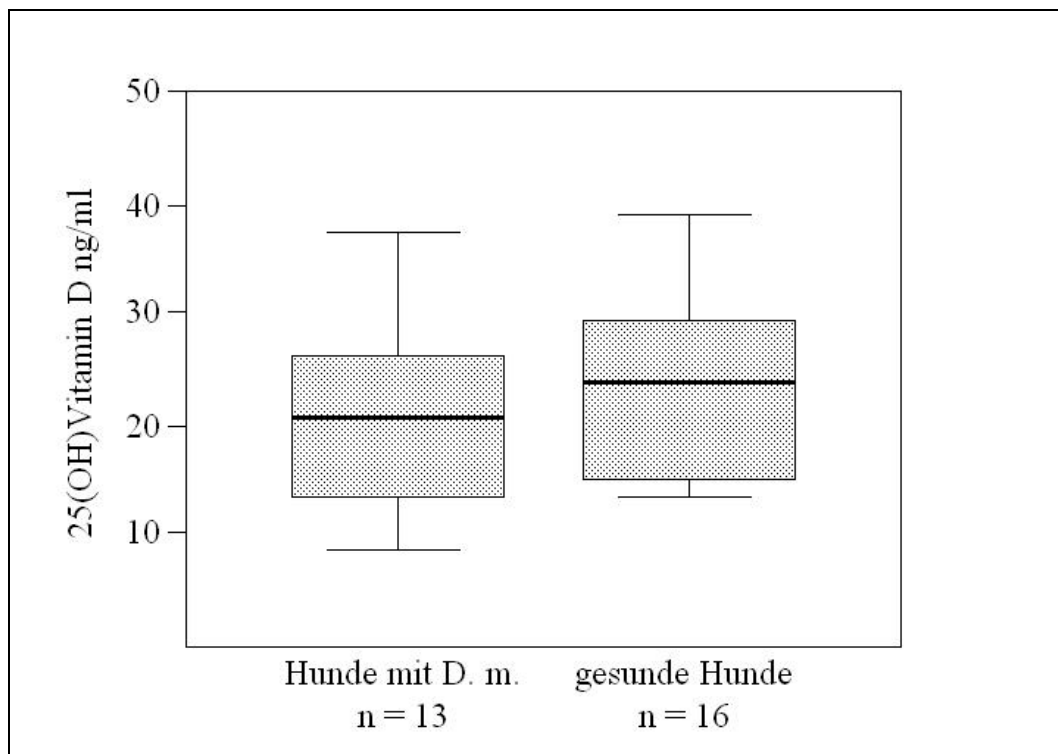


Abb. 5: Mittelwerte der 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel (dargestellt durch schwarze Linien)

#### 4.2. Messung der 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel

Auch die 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Konzentrationen im Blut von Hunden mit D. m. unterschieden sich nicht von denen der gesunden Kontrollgruppe. Hunde mit D. m. wiesen eine mittlere 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Konzentration von 31,17 pg/ml (n = 25, SD = 20,43) auf, gesunde Hunde eine mittlere 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Konzentration von 34,38 (n = 18, SD = 11,91). Die entsprechenden Boxplots sind in Abb. 6 wiedergegeben.

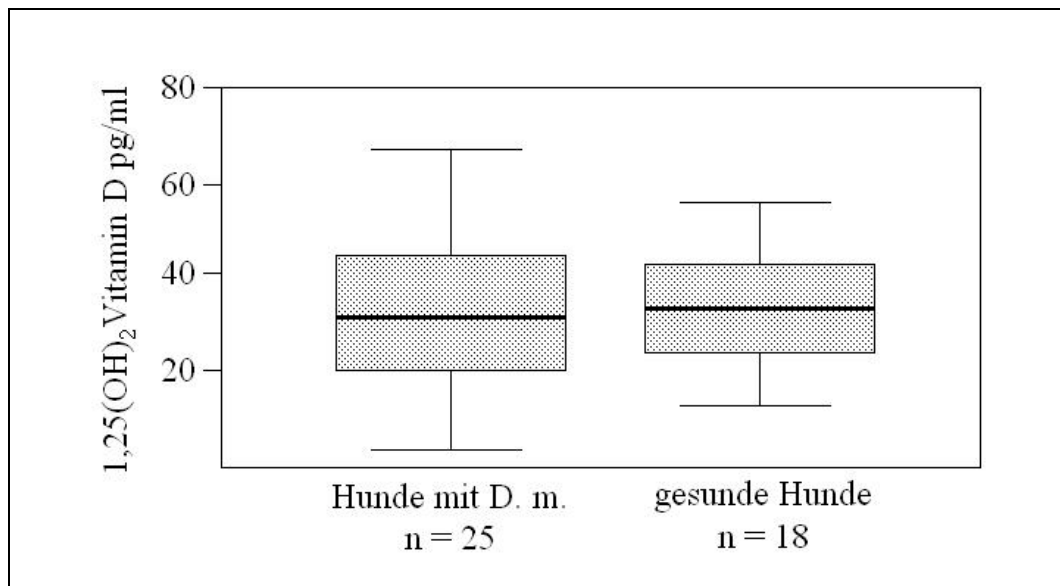


Abb. 6 Mittelwerte der 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Konzentrationen (dargestellt durch schwarze Linien)

## V. Diskussion

### 1. Vergleich der Genotypisierungsmethoden

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Methoden zur Genotypisierung angewandt: ARMS-PCR, Primer-Probe-Assay und Meltingcurve-PCR. Die Methoden wurden als bereits validiert aus der Literatur übernommen und mit den ohnehin vorliegenden Ergebnissen der Sequenzierung von 40 Hunden verglichen. Der SNP V7 wurde sowohl mittels ARMS-PCR als auch mittels Meltingcurve-PCR genotypisiert. Hier, wie auch beim Vergleich aller PCRs mit der Sequenzierung, stimmten alle Genotypen überein.

Die kostengünstigste Methode war die Meltingcurve-PCR, da hier nur Oligonukleotide ohne hybridisierte Fluoreszenzfarbstoffe verwendet wurden. Diese Methode war auch nicht sehr anfällig gegen Pipettierfehler und einfach in 96-Loch-Mikrotiterplatten durchzuführen. Die Auswertung war schnell und einfach von Hand durchführbar. Die Schwierigkeit bei der Meltingcurve-PCR war jedoch das Design spezifischer Primer, der Arbeitsaufwand war sehr hoch und viele Vorversuche waren erforderlich, da die Bindungsaffinität der Primer an die DNA trotz unterschiedlicher Länge annähernd gleich sein muss. Es gelang in der für diese Arbeit zur Verfügung stehenden Zeit nur die Entwicklung der Primer für einen SNP, so dass diese Methode optimal ist, wenn für wenige Mutationen viele Individuen schnell und kostengünstig genotypisiert werden sollen. Für die hier vorliegenden zehn SNPs wäre der Entwicklungsaufwand im Vergleich zur untersuchten Tierzahl zu hoch gewesen.

Der Entwicklungsaufwand für Primer und Sonden bei der ARMS-PCR war dagegen deutlich geringer, auch die Zahl der Vorversuche zur Ermittlung der geeigneten Reaktionsbedingungen war kleiner. Die Kosten lagen zwischen denen der beiden anderen Methoden, jedoch erforderte die ARMS-PCR einen sehr hohen Pipettieraufwand, da für jede Genotypisierung zwei Ansätze notwendig waren. Hier bestand auch die Gefahr von Pipettierfehlern, die zu falschen Genotypen führen können. Auch war die Auswertung etwas aufwendiger als bei der Meltingcurve-Analyse, da für jeden Genotyp zwei  $C_t$ -Werte abgelesen und subtrahiert werden mussten.

Das Design der Primer und Sonden des Primer-Probe-Assay wurde von der liefernden Firma übernommen, und außer der DNA mussten nur zwei Komponenten, der Mastermix und ein vorgefertigter Assay-Mix pipettiert werden.



Die Auswertung erfolgte für alle Individuen auf einmal, in einem Diagramm konnten per Mausklick alle Allele den jeweiligen Genotypen zugeordnet werden. Diese Methode war für die in dieser Arbeit vorliegende Kombination aus Anzahl der Individuen und Anzahl der SNPs die schnellste und einfachste, jedoch auch mit den höchsten Kosten aller drei Methoden verbunden.

## **2. Ätiologie des Diabetes mellitus bei Mensch und Hund**

Beim Menschen wird im Wesentlichen zwischen zwei Typen von D. m. unterschieden. Typ I D. m. kommt durch eine autoimmune Zerstörung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas und nachfolgend völligem Fehlen der Insulinsekretion zustande. Beim Typ II D. m. besteht meist primär kein Defekt in der Insulinsekretion, sondern eine periphere Insulinresistenz. Eventuell kommt es sekundär zur Zerstörung der  $\beta$ -Zellen durch Hypersekretion (KERNER et al., 2001).

Beim Hund sind sowohl Fälle bekannt, in denen eine primäre Insulinresistenz besteht (Hyperadrenokortizismus, diöstrusassoziierter D. m.), als auch Fälle, in denen eine Zerstörung der  $\beta$ -Zellen durch eine Entzündung des exokrinen Pankreas (Pankreatitis) vermutet wird (CATCHPOLE et al., 2005). Für einen Teil der Fälle, in denen keine Primärkrankheit nachgewiesen werden kann, wird das Vorliegen eines autoimmunen D. m. vermutet (GALE, 2005). Ein definitiver histopathologischer Nachweis oder der Nachweis von Autoantikörpern gegen  $\beta$ -Zellen fehlt jedoch bislang. Ob die Pathogenese dieser Fälle dem Typ I D. m. des Menschen gleicht und ob die Einteilung beim Hund in die beim Menschen üblichen Kategorien des D. m. erfolgen darf, ist deshalb bisher unklar.

### **2.1. Genetische Faktoren für die Entstehung von Diabetes mellitus**

D. m. ist sowohl beim Menschen als auch beim Hund eine Krankheit mit einer komplexen Ätiologie. Studien zur Erbllichkeit konnten zeigen, dass sowohl genetische als auch Umwelteinflüsse zur Entstehung dieser Erkrankung beitragen. Den Haupteinfluss auf die Erbllichkeit des humanen T1DM haben Veränderungen im HLA-Gen, das für den MHC kodiert und somit wesentlich zur Regulation der Autoimmunität im Körper beiträgt. Bislang konnten beim Menschen zwölf an der Erbllichkeit des T1DM beteiligten Gene gefunden werden, von denen mehrere die Immunantwort im Körper beeinflussen, darunter auch die Gene des LYP, des CTLA4 und des VDR (CORDELL & TODD, 1995; CATCHPOLE et al., 2005).

Auch beim Hund wird eine autoimmune Pathogenese des D. m. in manchen Fällen vermutet. Im homologen Gen des HLA beim Hund, dem DLA, konnten

ebenfalls Assoziationen von bestimmten genetischen Veränderungen mit D. m. gefunden werden (CATCHPOLE et al., 2005). Diese Arbeiten geben erste Hinweise darauf, dass tatsächlich eine autoimmune Komponente bei der Entstehung von D. m. ohne offensichtliche Primärkrankheit beim Hund vorhanden sein könnte. Daher wurden in dieser Studie sowohl genetische Polymorphismen des DLA-DQA1-Locus als auch in Analogie zum Menschen weitere Genorte, die zur Modulation der Immunantwort beitragen können, untersucht.

Es konnten, neben elf bereits publizierten SNPs im DLA-DQA1-Gen (KENNEDY et al., 2006), zehn bisher nicht veröffentlichte SNPs in den Genen des VDR, CTLA4 und LYP nachgewiesen werden. Die meisten SNPs wiesen keine unterschiedliche Verteilung zwischen der Gruppe der an D. m. erkrankten Hunde und der Kontrollgruppe auf, allerdings konnten mehrere DLA-DQA-Haplotypen und ein SNP im VDR-Gen mit einem veränderten Krankheitsrisiko assoziiert werden. Beim DQA-DLA1 Haplotyp DQA1\*00601 wurde wie auch beim Haplotyp DQA1\*00101 eine Häufung bei Hunden mit D. m. festgestellt. Beim Haplotyp DQA1\*00101 überdeckte jedoch das 95 % Konfidenzintervall die festgestellte Odds Ratio nur zum Teil, so dass dieses Ergebnis mit weniger als 95 % Wahrscheinlichkeit nicht auf Zufall beruht und damit nicht als statistisch signifikant anzusehen ist. Die beiden Haplotypen DQA1\*00401 und DQA1\*00501 verringerten jedoch in statistisch signifikanter Weise das Risiko von Hunden, an D. m. zu erkranken. Diese Ergebnisse sind konsistent mit denen der Arbeiten von Catchpole und Mitarbeiter (2005) sowie Kennedy und Mitarbeiter (2006), deren Untersuchungen sich jedoch zusätzlich auf die DRB- und DRQ-Allele des DLA-Gens bezogen. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass mit dem vorliegenden Studienaufbau grundsätzlich genetische Unterschiede in der untersuchten Population gefunden werden können und dienten somit als Positivkontrolle für die anderen untersuchten Genorte.

Polymorphismen in den MHC-Genen stellen eine möglichst breite Immunantwort in einer Population sicher. Beim Menschen sind Polymorphismen im MHC-Gen zehnmal häufiger als im Durchschnitt des Genoms, und auch bei vielen anderen Spezies konnte eine deutlich erhöhte Frequenz an Polymorphismen im MHC-Gen festgestellt werden (YEAGER & HUGHES, 1999; KIM & POLYCHRONAKOS, 2005). Das für den MHC kodierende HLA-Gen konnte mit über 40 Krankheiten in Zusammenhang gebracht werden, bei den meisten dieser Krankheiten steht eine

immunmedierte Pathogenese im Vordergrund. Die in verschiedenen Populationen vorherrschenden HLA-Haplotypen variieren stark, aufgrund von sozialen, ethnischen, religiösen oder geographischen Einschränkungen des Genpools. Auch unterschiedliche Umweltfaktoren wirken sich auf den Selektionsdruck auf bestimmte HLA-Haplotypen aus und damit auf deren Verteilung in verschiedenen Populationen (GHODKE et al., 2005). Dies führt dazu, dass in verschiedenen Population verschiedene Haplotypen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für die gleiche Krankheit behaftet sein können. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass diese verschiedenen Haplotypen für Aminosäuresequenzen mit ähnlichen Bindungseigenschaften kodieren. Damit prädisponieren sie durch identische Funktion (d. h. identische Epitopbindungseigenschaften) für bestimmte Autoimmunkrankheiten (THORSBY & LIE, 2005). Stärker noch als beim Menschen wurde beim Hund die HLA-Vielfalt eingeschränkt. Durch selektive Inzucht ergab sich eine starke Reduktion der Häufigkeit dieser Polymorphismen und damit der Diversifikation der Immunantwort. So haben manche Hunderassen, die bestimmte, prädisponierende Haplotypen häufiger tragen, Defekte des Immunsystems, andere mit anderen Haplotypen hingegen eine Neigung zu Autoimmunreaktionen (KENNEDY et al., 2006).

Die theoretisch mögliche Anzahl der aus den untersuchten elf SNPs zusammengesetzten DQA1-Haplotypen beträgt  $2^{11}$ . Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Haplotypen des DLA-DQA1-Lokus wurden sechs neue DQA1-Haplotypen gefunden, insgesamt kamen bei 216 untersuchten Allelen und 2048 theoretisch möglichen Haplotypen nur 16 verschiedene Haplotypen vor. Auch bei dem von uns untersuchten Tierkollektiv, das aus 33 verschiedenen Rassen und Mischlingshunden bestand, zeigt sich somit die eingeschränkte HLA-Vielfalt.

Eine weitere statistisch signifikante Assoziation mit D. m. wurde für den SNP V1 im VDR-Gen nachgewiesen. Der SNP V1 liegt vor der translatierten Sequenz des VDR-Gens in der für die Genregulation verantwortlichen Promoter-Region und könnte daher bei der Regulation der Transkription des VDR-Gens eine Rolle spielen. Die Sequenz, in der der SNP liegt, weist jedoch keine Homologie zu den bisher bekannten regulatorischen Bereichen des humanen VDR auf (MIYAMOTO et al., 1997). Auch mit den Sequenzen des murinen Sp1-Promoters im VDR konnte keine Homologie festgestellt werden (JEHAN & DELUCA, 2000). Ob neben der festgestellten Assoziation ein kausaler Zusammenhang zwischen der beobachteten Häufung des T-Allels des SNP V1 bei Hunden mit D.

m. besteht, konnte im Rahmen dieser Untersuchung nicht geklärt werden. Denkbar wäre ein Einfluss auf die Expression oder den Abbau der mRNA des VDR, was durch Experimente zur Promoteraktivität untersucht werden könnte.

Die SNPs, die in den Exons der VDR- und CTLA4-Gene gefunden wurden, führten nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz (stumme Mutationen). Eine kausale Verbindung dieser Polymorphismen zu möglicherweise veränderten Proteinen oder Expressionslevels ist daher unwahrscheinlich. Im Genom des Hundes kommen SNPs ca. alle 900 bp vor, und das Kopplungsungleichgewicht innerhalb einzelner Rassen ist über lange Strecken des Genoms sehr groß. Dies bedeutet, dass Polymorphismen über lange Strecken des Genoms innerhalb der einzelnen Rassen gemeinsam vererbt werden, und deswegen ein SNP, der in einem bestimmten Gen gefunden wird und der ein bestimmtes Hochrisiko-Allel repräsentiert, gemeinsam mit dem tatsächlich funktional verantwortlichen SNP vererbt werden kann und selbst keinerlei kausalen Zusammenhang mit dem jeweiligen Phänotyp aufweisen muss (LINDBLAD-TOH et al., 2005).

Im LYP-Gen codiert der SNP L1 als A-Allel für die Aminosäure Phenylalanin, als T-Allel für die Aminosäure Leucin. In der untersuchten Population konnten nur homozygote Träger des A-Allels und heterozygote A/T Träger gefunden werden. Die Tatsache, dass auch die heterozygoten Tiere sehr selten waren, macht es wahrscheinlich, dass das T-Allel unter starkem Selektionsdruck steht und in der Gesamtpopulation möglicherweise homozygote T-Allel-Träger überhaupt nicht vorkommen. Untersuchungen des LYP-Proteins auf funktionaler Ebene könnten weiteren Aufschluss über die Relevanz dieses Aminosäureaustausches und den damit eventuell verbundenen Konsequenzen für die Regulation der T-Zell-Aktivierung geben.

Die hier gefundenen Risiko-Allele und -Haplotypen bedeuten nicht unbedingt ein individuelles Risiko für den einzelnen Hund, an D. m. zu erkranken. Vielmehr zeigt die gefundene Allelstruktur die Zugehörigkeit zu einer Rasse, die für D. m. prädisponiert ist, an. Für die Untersuchung der individuellen Variabilität der Polymorphismen innerhalb der einzelnen Rassen und den Vergleich der Rassen untereinander war die untersuchte Tierzahl jedoch nicht ausreichend.

## **2.2. Vitamin-D-Status als nutritiver Faktor für das Entstehen von Diabetes**

Im Gegensatz zum Menschen, der aus der Vorstufe 7-DHC in der Haut Vitamin D<sub>3</sub> synthetisieren kann, muss der Hund Vitamin D<sub>3</sub> mit der Nahrung aufnehmen. Die Konzentration des 25(OH)Vitamin D<sub>3</sub> im Serum spiegelt die Menge des beim

Hund mit der Nahrung aufgenommenen Vitamin D<sub>3</sub> wieder (HOW et al., 1994). Dieser Parameter wird auch beim Menschen als Maß für die Versorgung mit Vitamin D herangezogen. Die 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Konzentration ist wenig geeignet, um eine ausreichende oder mangelnde Aufnahme der Vitamin-D-Vorstufen festzustellen, da die zweite Hydroxylierung durch negatives Feedback stark reguliert wird und die Menge des Endprodukts keine Aussage über das Vitamin-D-Angebot zulässt (SCHMIDT-GAYK et al., 1997).

Beim Menschen sind die benötigten, empfohlenen oder schädlichen Mengen an Vitamin D Gegenstand anhaltender Diskussionen. Sicher scheint zu sein, dass die bisher zur Vermeidung von Knochenschäden empfohlenen Mindestdosen zu gering sind, um wirksam vor Autoimmunerkrankungen zu schützen. Auch wurde die Gefahr einer Vitamin-D-Überdosierung bisher als zu hoch eingeschätzt (WHITING & CALVO, 2005). Untersuchungen zum Vitamin-D-Bedarf von Hunden fehlen bislang.

Für den Menschen konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen juvenilem Vitamin-D-Mangel und D. m., aber auch anderen Autoimmunkrankheiten nachgewiesen werden (CANTORNA & MAHON, 2004). Erwachsene Menschen mit T1DM haben normale 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel, außer sie leiden zusätzlich an einer manifesten diabetischen Nephropathie (STORM et al., 1983).

In der vorliegenden Arbeit wurden die 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel und die 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel bei gesunden und an D. m. erkrankten erwachsenen Hunden bestimmt. Wie beim Menschen unterschieden sich weder die 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel noch die 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel signifikant zwischen beiden untersuchten Gruppen, sofern die Altersstruktur der Gruppen vergleichbar war. Ob ein juveniler Vitamin-D-Mangel die Regulation des Immunsystems beim Hund negativ beeinflusst und damit zu einer erhöhten Inzidenz von Autoimmunkrankheiten wie z. B. D. m. führt, konnte mit dieser Studie nicht beantwortet werden. Ein Vitamin-D-Mangel als nutritiver ätiologischer Faktor beim erwachsenen Hund mit manifestem D. m. konnte allerdings weitgehend ausgeschlossen werden.

### **3. Limitationen dieser Studie**

In der Tiermedizin sind prospektive Studien, die an Untersuchungen an Patienten und nicht an Labortieren durchgeführt werden, sehr häufig gewissen

Beschränkungen unterworfen. Im Folgenden sollen einige Aspekte der vorliegenden Studie kritisch beleuchtet werden.

### **3.1. Tierzahl**

Bis auf SNP V1 waren alle Unterschiede in den Allelfrequenzen der SNPs der Gene des VDR, CTLA4 und des LYP nicht statistisch signifikant. Dies kann zum einen daran liegen, dass tatsächlich keine Unterschiede in den Allelfrequenzen in den untersuchten Genen vorliegen, zum anderen könnte auch die untersuchte Tierzahl zu klein sein, um vorhandene subtile Unterschiede nachzuweisen. Die Eignung einer Studie, Unterschiede bei einer bestimmten Allelfrequenz nachzuweisen oder auszuschließen wird als Teststärke oder statistische Power bezeichnet. Diese Teststärke wird normalerweise auf 80 % gesetzt, bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  (MANSFIELD, 2005). Die benötigte Tierzahl, um eine Teststärke von 80 % bei den gegebenen Allelfrequenzen zu erhalten, war bei keinem der SNPs des VDR-, CTLA4- und LYP-Gens gegeben.

Um für alle SNPs eine endgültige Aussage über den Zusammenhang von Allelfrequenzen und D. m. treffen zu können, wären deutlich größere Tierzahlen nötig. Da die Teststärke von der Effektgröße und damit von den vorliegenden Allelfrequenzen abhängt, konnte im Voraus keine Aussage über die benötigte Tierzahl getroffen werden. Erst im Lauf der Studie wurde deutlich, dass in der veranschlagten Zeit keine ausreichende Tierzahl für gesicherte Aussagen über die meisten SNPs zu erreichen war.

### **3.2. Patientenkollektiv**

Aufgrund der kleinen Tierzahl wurden ausnahmslos alle Hunde mit D. m. in die Studie aufgenommen, bis auf ein Tier mit einem angeborenen D. m. und zwei Tieren mit einem bestätigten Gestationsdiabetes. Die sichere Diagnose eines Gestationsdiabetes, der wahrscheinlich keine genetische Prädisposition aufweist, ist nur schwer möglich. Der Ausschluss aller zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nicht kastrierten weiblichen Tiere wäre also geboten gewesen (CATCHPOLE et al., 2005). Dies geschah aufgrund der sowieso schon kleinen Tierzahl ebenso wenig wie der Ausschluss aller Tiere mit einer bestätigten Diagnose von Hyperadrenokortizismus. Da die Diagnose eines autoimmunen D. m. analog des menschlichen T1DM auf der Basis der Messung von Autoantikörpern oder eines pathohistologischen Nachweises einer autoimmunen Insulitis bisher nicht möglich ist, bleibt der (vermutete) autoimmune D. m. des Hundes eine Ausschlussdiagnose (GALE, 2005).

Auch Tiere, die vor Beginn des D. m. an einer Entzündung des exokrinen Anteils der Bauchspeicheldrüse (Pankreatitis) leiden, sollten deshalb keinen Eingang in eine Studie zu den genetischen Ursachen einer vermuteten Autoimmunerkrankung finden (CATCHPOLE et al., 2005). Diese Einschränkungen in den Ausschlusskriterien wurden in Kauf genommen, da die vorliegende Arbeit vornehmlich dem Zweck diene, Methoden für die Untersuchung eines strikter definierten, größeren Patientenkollektivs zu etablieren sowie Kandidatengene für eine solche Untersuchung zu beschreiben.

### **3.3. Kontrollgruppe**

Die Kontrollgruppe bestand aus 77 klinisch gesunden Hunden, die hauptsächlich im Besitz von Studenten und Mitarbeitern der Tiermedizinischen Fakultät der LMU München waren. Außerdem wurden Patienten, die zur Impfung an die Medizinische Kleintierklinik München gebracht wurden und Patienten, die an der Dobermannstudie der Abteilung für Kardiologie teilnahmen, heran gezogen. Zwar entsprach die Rassenverteilung der Kontrollgruppe insgesamt jener der Hunde mit D. m., jedoch standen sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Gruppe der erkrankten Hunde nicht genügend Tiere zur Verfügung, um innerhalb der Rassen Vergleiche anzustellen.

Eine Anpassung des Alters der Kontrollgruppe erfolgte nur bei der Messung der 25(OH)-Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel, da hier erstens genügend Tiere zur Verfügung standen und zweitens beim initialen Vergleich einer nicht altersentsprechenden Kontrollgruppe mit der Gruppe der erkrankten Hunde ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der 25(OH)-Vitamin-D<sub>3</sub>-Konzentrationen ersichtlich war. Dieser Unterschied trat bei Verwendung einer altersentsprechenden Kontrollgruppe jedoch nicht mehr auf.

Die Verwendung einer Kontrollgruppe bei genetischen Untersuchungen, die den caninen D. m. betreffen, ist deswegen problematisch, weil D. m. erst bei Hunden in der zweiten Lebenshälfte auftritt und daher Hunde, die in der Kontrollgruppe als Hunde ohne D. m. geführt werden, im Laufe ihres Lebens noch einen D. m. entwickeln können, jedoch dann in ihrem Genotyp fälschlicherweise der Gruppe ohne D. m. zugerechnet werden. Allerdings gibt es kein bestimmtes Schwellenalter, ab dem Hunde keinen D. m. mehr entwickeln, so dass strenggenommen erst nach dem Tod des Tieres eine Kategorisierung in die jeweilige Gruppe möglich ist.

### **3.4. Studiendesign**

Der Ansatz, Kandidatengene, die sich aus funktionalen pathophysiologischen Überlegungen herleiten, auf Polymorphismen zu untersuchen und deren Häufigkeit zwischen erkrankten und gesunden Individuen zu vergleichen, hat in der Humanmedizin vielfach zum Erfolg geführt. Beim Hund jedoch sind nur wenige Studien veröffentlicht worden, die einen Zusammenhang zwischen SNPs und einer bestimmten Krankheit darlegen konnten (SOLLER et al., 2006; ZANGERL et al., 2006). Die meisten dieser Studien konnten entweder aufgrund zu geringer Tierzahlen keine statistisch signifikante Aussage treffen oder die untersuchten Kandidatengene waren nicht an der Pathogenese beteiligt (WILKE et al., 2005; LIPPMANN et al., 2006; SKELLY & FRANKLIN, 2006; WOHLKE et al., 2006). Dies mag zum einen an der Auswahl der Kandidatengene liegen, denn auch wenn bei Mensch und Hund auf klinischer oder pathologischer Ebene vergleichbare Krankheitsbilder gefunden werden, können die molekularen Mechanismen unterschiedlich sein. Zum anderen fehlt es aber, wie bei der vorliegenden Studie, in der Tiermedizin häufig an genau definierten Krankheitsentitäten und damit an strikten Einschlusskriterien und homogenen Patientenkollektiven. Dies gilt insbesondere für Krankheiten, an denen mehrere Genorte beteiligt sind und bei denen Umwelteinflüsse eine große Rolle spielen. Die genomweite Suche nach Kandidatengenen und der Ansatz, betroffene und nicht betroffene Familienmitglieder zu untersuchen statt unabhängiger Patientenkollektive, hat sich in einigen Fällen als vielversprechender herausgestellt (YUZHASIYAN-GURKAN et al., 1997; HUNTER et al., 2006).

### **4. Relevanz der vorliegenden Studie**

D. m. ist eine der häufigsten Endokrinopathien beim Hund (CATCHPOLE et al., 2005), und die Insulintherapie ist kostenintensiv, aufwendig und ohne die entsprechende aktive Mitarbeit der Patientenbesitzer unmöglich (FELDMAN & NELSON, 2004). Im Sinne der Zuchthygiene ist daher die Identifikation von erblichen Risikofaktoren, häufig betroffenen Rassen und von Individuen, die Risikofaktoren tragen, wünschenswert. Die vorliegende Arbeit ist die bisher einzige, in der ein möglicher Zusammenhang mehrerer Kandidatengene mit caninem D. m. untersucht wurde.

Zur wirksamen Prävention dieser häufigen und schwerwiegenden Krankheit muss jedoch auch die Bedeutung von Umweltfaktoren untersucht werden. Durch die



Bestimmung der Vitamin-D-Spiegel wurde der Versuch unternommen, die Bedeutung eines nutritiven Faktors mit beim Menschen nachgewiesenem Einfluss auf das Immunsystem abzuschätzen.

Beim Menschen wurden die Gene mit dem größten Einfluss auf die Erbllichkeit des T1DM bereits identifiziert, und der eindeutige Nachweis einer autoimmunen Ätiologie der Krankheit wurde serologisch und histopathologisch erbracht. Zusätzlich ist der Nachweis der Autoimmunerkrankung beim Einzelpatienten durch den Nachweis von Autoantikörpern im Serum routinemäßig möglich (GILLESPIE). Die Ätiologie des caninen D. m. konnte mit serologischen und histopathologischen Methoden bisher noch nicht aufgeklärt werden (GEPTS & TOUSSAINT, 1967; HAINES, 1986; ALEJANDRO et al., 1988; CATCHPOLE et al., 2005). Daher könnte ein Nachweis von Veränderungen in für Autoimmunität relevanten Genen die These stützen, dass ein Teil der caninen D.-m.-Fälle autoimmuner Genese ist. Hierzu wurden die beim menschlichen T1DM relevanten Kandidatengene des VDR, des CTLA4 und des LYP sowie ein Teil des MHC-Locus auch beim Hund untersucht und Methoden etabliert, die größere Studien an mehr Patienten effizient und kostengünstig möglich machen.

## **5. Ausblick**

Größere Studien mit mehr Tieren, die strikter angewandte Ausschlusskriterien und ausreichende Teststärke ermöglichen, könnten die genetischen Hintergründe des caninen D. m. gründlicher aufklären. Die morphologische und pathologisch-histologische Untersuchung der Ätiologie konnte bisher keine schlüssigen Beweise hinsichtlich der autoimmunen Pathogenese des caninen D. m. liefern. Auch der serologische Nachweis von Autoantikörpern gegen  $\beta$ -Zellen oder körpereigenes Insulin konnte noch nicht überzeugend geführt werden. Veränderungen in Genen, die mit der Regulation der Autoimmunität in Zusammenhang stehen, könnten dagegen die Hypothese der autoimmunen Genese des caninen D. m. stützen.

Wenn die Ätiologie des caninen D. m. zweifelsfrei bewiesen werden kann, und wie beim Menschen ein Zeitpunkt einer beginnenden Autoimmunreaktion definiert werden kann, ist eine Intervention mit gezielten Eingriffen in die Kaskade der Autoimmunität denkbar. Beim Menschen wurden bereits teilweise erfolgreiche Studien mit dem gezielten Einsatz immunmodulatorischer Pharmaka bei Risikopatienten durchgeführt (CABRERA-RODE et al., 2006; CERNEA & HEROLD, 2006), und auch beim Hund wäre ein Eingreifen in frühere Stadien des

Krankheitsprozesses denkbar, sobald Individuen mit erhöhtem Risiko sicher zu identifizieren sind.

Die Aufklärung der Ätiologie des caninen D. m. könnte auch der Humanmedizin ein Tiermodell für spontanen multikausalen D. m. zur Verfügung stellen. Der Hund als Modellorganismus für den menschlichen D. m. bietet im Vergleich zu Nagermodellen den Vorteil, dass er den gleichen Umweltfaktoren wie der Mensch ausgesetzt ist und viele verschiedene Rassen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund vorliegen, die teilweise die Diversität menschlicher Patientenkollektive (z. B. verschiedene Ethnien) widerspiegeln und so die Interaktion zwischen genetischer Prädisposition und dem Einfluss der Umwelt erforschbar machen (LINDBLAD-TOH et al., 2005; KENNEDY et al., 2006).

Die Inzuchtlinien der Nagerdiabetesmodelle haben den Nachteil, dass ihr genetischer Hintergrund sehr eng begrenzt ist. Gene, die auf einem speziellen genetischen Hintergrund für D. m. verantwortlich sind, müssen dies auf einem anderen genetischen Hintergrund nicht zwangsläufig auch sein. Der Hund bietet als „Auszuchtstamm“ den Vorteil einer breiten Genvariabilität. Auch existiert bisher kein Nagermodell für den humanen LADA; hier könnte der Hund als Modellorganismus dienen (REES & ALCOLADO, 2005), da der canine D. m. wie der LADA spontan bei adulten Individuen entstehen kann. Der Tiermedizin könnte der Nachweis einer autoimmunen Ätiologie des caninen D. m. ein tieferes Verständnis der Pathogenese und damit erweiterte Therapieoptionen ermöglichen.

Die Rolle von Vitamin D als regulatorischem Faktor des caninen Immunsystems wurde bisher kaum untersucht. Beim Menschen hingegen ist die Rolle, die Vitamin D als potenter Faktor nicht nur bei der Regulation der Autoimmunität, sondern auch bei der Infektabwehr und bei der Tumorgenese spielt, in vielen Studien gut dokumentiert.

Vitamin D wirkt antiproliferativ und konnte *in vitro* und in verschiedenen Tiermodellen die Proliferation von Krebszellen hemmen. Vitamin D fördert die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und ist so an der Abwehr von Bakterien und der Bekämpfung von Tumorzellen beteiligt. Eine erhöhte Inzidenz von Autoimmunkrankheiten bei Menschen mit Vitamin-D-Mangel konnte genauso nachgewiesen werden wie ein protektiver Effekt gegenüber Glomerulosklerose (CANTORNA & MAHON, 2004; DUSSO et al., 2005; NORMAN, 2006).

Da der Hund Vitamin D nur über die Nahrung aufnehmen kann, stellt sich hier noch in viel größerem Maße die Frage, wann die Vitamin-D-Versorgung als ausreichend angesehen werden kann und ob ältere Hunde, wie ältere Menschen auch, von einer oralen Vitamin-D-Supplementierung profitieren könnten. Studien über den Vitamin-D-Bedarf von Hunden in verschiedenen Lebensstadien oder über Vitamin-D-Mangel als nutritivem Faktor bei caninen Autoimmunkrankheiten fehlen bisher.

## **VI. Zusammenfassung**

### **Genetische und nutritive Faktoren bei der Entstehung von Diabetes mellitus beim Hund: Untersuchungen zu Polymorphismen in vier Kandidatengenen und zur Vitamin-D-Versorgung**

Diabetes mellitus (D. m.) ist eine der häufigsten endokrinen Krankheiten des Hundes, die in vielen Fällen auf mangelnde Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas zurückzuführen ist. Die Ätiologie dieser beim Menschen als Typ I bezeichneten Form des D. m. ist beim Hund nicht abschließend geklärt. Beim Menschen wird von einer Autoimmunerkrankung ausgegangen, für die sowohl genetische Prädispositionen als auch potentiell immunmodulatorische Umweltfaktoren eine Rolle spielen.

Mehrere Studien fanden Assoziationen zwischen D. m. und Polymorphismen (Abweichungen von der normalen Nukleotidsequenz) der Gene des Major Histocompatibility Complex (DLA), der Lymphoid-Tyrosin-Phosphatase (LYP), des Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA4) und des Vitamin-D-Rezeptors (VDR). Alle diese Gene spielen beim Menschen eine Rolle bei der Präsentation von körpereigenen Antigenen und der Unterdrückung oder Förderung der Autoimmunität und wurden in der vorliegenden Studie auch beim Hund auf Polymorphismen untersucht.

Es wurde von 51 Hunden mit D. m. und 77 gesunden Hunden DNA aus peripheren Blutleukozyten isoliert. Anschließend wurde ein Teil der Exons und der Intron-Exon-Grenzen der oben genannten Gene mittels PCR amplifiziert. Mittels Sequenzierung und anschließendem Alignment der Sequenzen wurden 21 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) gefunden, davon zehn bisher unpublizierte. Drei verschiedene SNP-PCR-Methoden wurden für die Genotypisierung der SNPs in den Genen des LYP, CTLA4 und VDR angewendet und die Allelfrequenzen aller SNPs bestimmt. Um die SNPs im DLA-Gen zu untersuchen wurde dieses bei allen Hunden sequenziert.

Hunde mit D. m. trugen signifikant häufiger das T-Allel an SNP V1 im Vitamin-D-Rezeptor-Gen (53 % der Hunde mit D. m., 29 % der gesunden Hunde), gesunde Hunde häufiger das C-Allel (16% der Hunde mit D. m., 29 % der gesunden Hunde). Zwei protektive Haplotypen (DQA1\*00501/DQA1\*00401) und zwei

Haplotypen mit erhöhtem Risiko für D. m. (DQA1\*00601/DQA1\*00101) konnten im DLA-Gen gefunden werden.

Da Vitamin D immunmodulatorische Wirkungen besitzt und beim Menschen ein nachgewiesener Zusammenhang zwischen juvenilem Vitamin-D-Mangel und D. m. besteht, wurden die Vitamin-D-Spiegel von gesunden Hunden mit denen von Hunden mit D. m. verglichen. Bei 29 Hunden (13 mit D. m., 16 gesunde) wurden die 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel bestimmt. Bei 43 Hunden (25 mit D. m., 18 gesunde) wurden die 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel bestimmt.

Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte weder bei den 25(OH)Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegeln noch bei den 1,25(OH)<sub>2</sub>Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegeln nachgewiesen werden.

Aufgrund der zu geringen Tierzahl konnte nicht bei allen SNPs ein Zusammenhang zwischen Unterschieden in den Allelfrequenzen und D. m. hergestellt werden. Die vorliegende Studie diene daher im wesentlichen der Etablierung von effizienten Methoden zur SNP-Genotypisierung und der Beschreibung von Kandidatengenen des caninen D. m., um ein größeres Patientenkollektiv untersuchen zu können.

## VII. Summary

### **Genetic and nutritive factors in the etiology of canine diabetes mellitus: Investigations of polymorphisms in four candidate genes and the vitamin-D-status of diabetic dogs**

Diabetes mellitus (d. m.) is among the most common endocrinopathies in dogs. Insufficient secretion of insulin by pancreatic  $\beta$ -cells is the underlying cause of D. m. in many diabetic dogs. Insulin deficiency d. m. in humans is due to autoimmune destruction of  $\beta$ -cells, the etiology of the canine insulin deficiency d. m. remains to be clarified. Human insulin deficiency d. m. is referred to as type I d. m. (T1DM).

In T1DM, both genetic and environmental factors contribute to an autoimmune inflammation of  $\beta$ -cells and their subsequent destruction. Correlations between polymorphisms (changes in normal nucleotide sequence) in the genes of the major histocompatibility complex (DLA), the lymphoid-tyrosin-phosphatase (LYP), the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) and the vitamin-D-receptor (VDR) and T1DM were detected in several studies on human patients. All these genes are known to play an important role in the regulation of autoimmunity or the presentation of antigen in humans.

This study investigated single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the canine homologues of these genes. For this purpose, DNA was isolated from peripheral blood leukocytes of 51 dogs suffering from d. m. and 77 healthy control dogs. Exons and exon-intron boundaries of the aforementioned genes were amplified by PCR and sequenced in a commercial laboratory. The sequences were aligned and 21 polymorphisms (ten previously unpublished) could be detected. For all polymorphisms in the genes of the LYP, CTLA, and VDR, SNP-PCRs were set up for genotyping and allele frequencies were calculated. In DLA, genotypes were determined by means of sequencing.

The allele frequency for the T-allele in SNP V1 (VDR-gene) was significantly increased in dogs with d. m. (T: 53 % in diabetic dogs, 29 % in healthy dogs) compared to healthy dogs, who bore the C-allele more often (C: 16% in diabetic dogs, 29 % in healthy dogs). Two haplotypes (DQA1\*00501/. DQA1\*00401) in the DLA gene coding for the major histocompatibility complex were found to be protective against d. m., two other haplotypes (DQA1\*00601/ DQA1\*00101) were correlated with a higher risk of d. m.

In humans, a correlation between juvenile vitamin-D-deficiency and an increased risk of d. m. could be detected, and there is evidence for vitamin D holding immunomodulatory properties. Vitamin-D-levels of dogs with d. m. were compared to those of healthy dogs. 25(OH)vitamin-D<sub>3</sub>-levels were measured in 29 dogs (13 diabetic, 16 healthy), 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamin-D<sub>3</sub>-levels were measured in 43 dogs (25 diabetic, 18 healthy). Significant differences could be measured neither in levels of 25(OH)vitamin D<sub>3</sub> nor in levels of 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub>.

Animal numbers were too small to detect correlations with differences in allele frequencies between dogs with d. m. and healthy controls for most SNPs. Further research is warranted with the methods and candidate genes established in this preliminary study.

## VIII. Literaturverzeichnis

- Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998;15(7):539-53.
- Alejandro R, Feldman EC, Shienvold FL, Mintz DH. Advances in canine diabetes mellitus research: etiopathology and results of islet transplantation. *J Am Vet Med Assoc* 1988;193(9):1050-5.
- Aliahmad P, Kaye J. Commitment issues: linking positive selection signals and lineage diversification in the thymus. *Immunol Rev* 2006;209:253-73.
- Almawi WY, Tamim H, Azar ST. Clinical review 103: T helper type 1 and 2 cytokines mediate the onset and progression of type I (insulin-dependent) diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(5):1497-502.
- Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* 2005;23(2):227-39.
- Atkinson MA, Ellis TM. Infants diets and insulin-dependent diabetes: evaluating the "cows' milk hypothesis" and a role for anti-bovine serum albumin immunity. *J Am Coll Nutr* 1997;16(4):334-40.
- Babaya N, Nakayama M, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051:194-204.
- Bagdade JD, Root RK, Bulger RJ. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 1974;23(1):9-15.
- Beam S, Correa MT, Davidson MG. A retrospective-cohort study on the development of cataracts in dogs with diabetes mellitus: 200 cases. *Vet Ophthalmol* 1999;2(3):169-72.
- Bennett N. Monitoring techniques for diabetes mellitus in the dog and the cat. *Clin Tech Small Anim Pract* 2002;17(2):65-9.
- Betz AL, Gilboe DD, Drewes LR. The characteristics of glucose transport across the blood brain barrier and its relation to cerebral glucose metabolism. *Adv Exp Med Biol* 1976;69:133-49.
- Bloomgarden ZT. Glycemic treatment in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29(11):2549-55.
- Böck P, Liebich H. Endokrines System. In: Liebich H, editor. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*. 4 ed. Stuttgart: Schattauer GmbH; 2004. p. 184-6.
- Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001;167(9):4974-80.
- Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellecchia M, Eisenbarth GS, Comings D, Mustelin T. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004;36(4):337-8.
- Bottini N, Vang T, Cucca F, Mustelin T. Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Semin Immunol* 2006;18(4):207-13.
- Cabrera-Rode E, Molina G, Arranz C, Vera M, Gonzalez P, Suarez R, Prieto M, Padron S, Leon R, Tillan J, Garcia I, Tiberti C, Rodriguez OM, Gutierrez A, Fernandez T, Govea A, Hernandez J, Chiong D, Dominguez E, Di Mario U, Diaz-Diaz O, Diaz-Horta O. Effect of standard nicotinamide in the prevention of type 1 diabetes in first degree relatives of persons with type 1 diabetes. *Autoimmunity* 2006;39(4):333-40.



- Campbell KL, Latimer KS. Transient diabetes mellitus associated with prednisone therapy in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1984;185(3):299-301.
- Cantorna MT, Woodward WD, Hayes CE, DeLuca HF. 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF-beta 1 and IL-4. *J Immunol* 1998;160(11):5314-9.
- Cantorna MT, Mahon BD. Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004;229(11):1136-42.
- Catchpole B, Ristic JM, Fleeman LM, Davison LJ. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks? *Diabetologia* 2005;48(10):1948-56.
- Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. Role of advanced glycosylation products in complications of diabetes. *Diabetes Care* 1988;11 Suppl 1:73-9.
- Cernea S, Herold KC. Drug insight: New immunomodulatory therapies in type 1 diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006;2(2):89-98.
- Chambers CA, Kuhns MS, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) regulates primary and secondary peptide-specific CD4(+) T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(15):8603-8.
- Chang TJ, Lei HH, Yeh JI, Chiu KC, Lee KC, Chen MC, Tai TY, Chuang LM. Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;52(5):575-80.
- Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 1995;16(2):117-42.
- Classen JB, Classen DC. Immunisation and type 1 diabetes mellitus: is there a link? *Drug Saf* 1999;21(5):423-5.
- Clements GB, Galbraith DN, Taylor KW. Coxsackie B virus infection and onset of childhood diabetes. *Lancet* 1995;346(8969):221-3.
- Cordell HJ, Todd JA. Multifactorial inheritance in type 1 diabetes. *Trends Genet* 1995;11(12):499-504.
- Daminet S. Canine and Feline Diabetes mellitus. In: 28th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association; 2003; Bangkok, Thailand; 2003.
- Danisi G, Bonjour JP, Straub RW. Regulation of Na-dependent phosphate influx across the mucosal border of duodenum by 1,25-dihydroxycholecalciferol. *Pflugers Arch* 1980;388(3):227-32.
- Davison LJ, Ristic JM, Herrtage ME, Ramsey IK, Catchpole B. Anti-insulin antibodies in dogs with naturally occurring diabetes mellitus. *Vet Immunol Immunopathol* 2003;91(1):53-60.
- Davison LJ, Herrtage ME, Catchpole B. Study of 253 dogs in the United Kingdom with diabetes mellitus. *Vet Rec* 2005;156(15):467-71.
- Diehl KJ. Long-term complications of diabetes mellitus, Part II: Gastrointestinal and infectious. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1995;25(3):731-51.
- Dominici FP, Turyn D. Growth hormone-induced alterations in the insulin-signaling system. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002;227(3):149-57.
- Donner H, Rau H, Walfish PG, Braun J, Siegmund T, Finke R, Herwig J, Usadel KH, Badenhop K. CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(1):143-6.
- Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289(1):F8-28.
- Elliott DA, Nelson RW, Feldman EC, Neal LA. Glycosylated hemoglobin concentrations in the blood of healthy dogs and dogs with naturally developing

- diabetes mellitus, pancreatic beta-cell neoplasia, hyperadrenocorticism, and anemia. *J Am Vet Med Assoc* 1997;211(6):723-7.
- Feldman EC, Nelson RW. The endocrine pancreas. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 3 ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2004. p. 486-615.
- Flier JS. Insulin receptors and insulin resistance. *Annu Rev Med* 1983;34:145-60.
- Gale EA. Do dogs develop autoimmune diabetes? *Diabetologia* 2005;48(10):1945-7.
- Gepts W, Toussaint D. Spontaneous diabetes in dogs and cats. A pathological study. *Diabetologia* 1967;3(2):249-65.
- Gerich JE. Lilly lecture 1988. Glucose counterregulation and its impact on diabetes mellitus. *Diabetes* 1988;37(12):1608-17.
- Gershwin LJ. Familial canine diabetes mellitus. *J Am Vet Med Assoc* 1975;167(6):479-80.
- Ghodke Y, Joshi K, Chopra A, Patwardhan B. HLA and disease. *Eur J Epidemiol* 2005;20(6):475-88.
- Gillespie KM. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. *CMAJ* 2006;175(2):165-70.
- Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. Nuclear receptor coactivators. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(2):222-32.
- Goodman HM. Basic Medical Endocrinology. In. 3 ed. San Diego: Academic Press; 2003. p. 178-200.
- Graham PA, Maskell E, Rawlings JM, Nash AS, Markwell PJ. Influence of a high fibre diet on glycaemic control and quality of life in dogs with diabetes mellitus. *J Small Anim Pract* 2002;43(2):67-73.
- Grawunder U, West RB, Lieber MR. Antigen receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol* 1998;10(2):172-80.
- Gray IC, Campbell DA, Spurr NK. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum Mol Genet* 2000;9(16):2403-8.
- Greco DS. Diagnosis of diabetes mellitus in cats and dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2001;31(5):845-53, v-vi.
- Guptill L, Glickman L, Glickman N. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records (1970-1999). *Vet J* 2003;165(3):240-7.
- Haddad JG, Matsuoaka LY, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest* 1993;91(6):2552-5.
- Haines DM, Penhale WJ. Autoantibodies to pancreatic islet cells in canine diabetes mellitus. *Vet Immunol Immunopathol* 1985;8(1-2):149-56.
- Haines DM. A re-examination of islet cell cytoplasmic antibodies in diabetic dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1986;11(3):225-33.
- Havard RE, Hoyle JC. Vitamin D in adults: Its effect on the calcium and inorganic phosphate of the blood. *Biochem J* 1928;22(3):713-6.
- Hess RS, Kass PH, Shofer FS, Van Winkle TJ, Washabau RJ. Evaluation of risk factors for fatal acute pancreatitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1999;214(1):46-51.
- Hess RS, Kass PH, Ward CR. Breed distribution of dogs with diabetes mellitus admitted to a tertiary care facility. *J Am Vet Med Assoc* 2000;216(9):1414-7.
- Hess RS, Saunders HM, Van Winkle TJ, Ward CR. Concurrent disorders in dogs with diabetes mellitus: 221 cases (1993-1998). *J Am Vet Med Assoc* 2000;217(8):1166-73.

- Hess RS. Use of oral hypoglycemics in diabetic dogs and cats. In: North American Veterinary Conference; 2006; Orlando, Florida; 2006.
- Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 2005;85(1):373-422.
- Hoenig M, Dawe DL. A qualitative assay for beta cell antibodies. Preliminary results in dogs with diabetes mellitus. *Vet Immunol Immunopathol* 1992;32(3-4):195-203.
- Hoenig M. Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. *Mol Cell Endocrinol* 2002;197(1-2):221-9.
- Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT, Jr., Anderson RR, Blank IH, Parrish JA, Elias P. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science* 1980;210(4466):203-5.
- Holick MF. The cutaneous photosynthesis of previtamin D3: a unique photoendocrine system. *J Invest Dermatol* 1981;77(1):51-8.
- Holick MF. Skin: site of the synthesis of vitamin D and a target tissue for the active form, 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Ann N Y Acad Sci* 1988;548:14-26.
- Hollander MH, Paarlberg KM, Huisjes AJ. Gestational diabetes: a review of the current literature and guidelines. *Obstet Gynecol Surv* 2007;62(2):125-36.
- Holmberg D, Cilio CM, Lundholm M, Motta V. CTLA-4 (CD152) and its involvement in autoimmune disease. *Autoimmunity* 2005;38(3):225-33.
- Holste LC, Nelson RW, Feldman EC, Bottoms GD. Effect of dry, soft moist, and canned dog foods on postprandial blood glucose and insulin concentrations in healthy dogs. *Am J Vet Res* 1989;50(6):984-9.
- Hosszufalusi N, Vatay A, Rajczy K, Prohaszka Z, Pozsonyi E, Horvath L, Grosz A, Gero L, Madacsy L, Romics L, Karadi I, Fust G, Panczel P. Similar genetic features and different islet cell autoantibody pattern of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) compared with adult-onset type 1 diabetes with rapid progression. *Diabetes Care* 2003;26(2):452-7.
- How KL, Hazewinkel HA, Mol JA. Dietary vitamin D dependence of cat and dog due to inadequate cutaneous synthesis of vitamin D. *Gen Comp Endocrinol* 1994;96(1):12-8.
- Huhtakangas JA, Olivera CJ, Bishop JE, Zanello LP, Norman AW. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds 1 alpha,25(OH)2-vitamin D3 in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol* 2004;18(11):2660-71.
- Hume DZ, Drobatz KJ, Hess RS. Outcome of dogs with diabetic ketoacidosis: 127 dogs (1993-2003). *J Vet Intern Med* 2006;20(3):547-55.
- Hunter LS, Sidjanin DJ, Johnson JL, Zangerl B, Galibert F, Andre C, Kirkness E, Talamas E, Acland GM, Aguirre GD. Radiation hybrid mapping of cataract genes in the dog. *Mol Vis* 2006;12:588-96.
- Hytty H, Taylor KW. The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* 2002;45(10):1353-61.
- Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001;358(9292):1500-3.
- Imagawa A, Hanafusa T, Miyagawa J, Matsuzawa Y. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med* 2000;342(5):301-7.
- Imamura T, Koffler M, Helderman JH, Prince D, Thirlby R, Inman L, Unger RH. Severe diabetes induced in subtotally depancreatized dogs by sustained hyperglycemia. *Diabetes* 1988;37(5):600-9.

- Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Yamagata K, Yamamoto K, Waguri M, Imagawa A, Tamura S, Inada M, et al. Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Invest* 1993;92(5):2313-22.
- James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 1999;353(9165):1634-6.
- Jeffers JG, Shanley KJ, Schick RO. Diabetes mellitus induced in a dog after administration of corticosteroids and methylprednisolone pulse therapy. *J Am Vet Med Assoc* 1991;199(1):77-80.
- Jehan F, DeLuca HF. The mouse vitamin D receptor is mainly expressed through an Sp1-driven promoter in vivo. *Arch Biochem Biophys* 2000;377(2):273-83.
- Kaplan JR, Wagner JD. Type 2 diabetes-an introduction to the development and use of animal models. *Ilar J* 2006;47(3):181-5.
- Kennedy LJ, Carter SD, Barnes A, Bell S, Bennett D, Ollier B, Thomson W. Interbreed variation of DLA-DRB1, DQA1 alleles and haplotypes in the dog. *Vet Immunol Immunopathol* 1999;69(2-4):101-11.
- Kennedy LJ, Angles JM, Barnes A, Carter SD, Francino O, Gerlach JA, Happ GM, Ollier WE, Thomson W, Wagner JL. Nomenclature for factors of the dog major histocompatibility system (DLA), 2000: Second report of the ISAG DLA Nomenclature Committee. *Tissue Antigens* 2001;58(1):55-70.
- Kennedy LJ, Davison LJ, Barnes A, Short AD, Fretwell N, Jones CA, Lee AC, Ollier WE, Catchpole B. Identification of susceptibility and protective major histocompatibility complex haplotypes in canine diabetes mellitus. *Tissue Antigens* 2006;68(6):467-76.
- Kerner W, Brückel J, Böhm BO. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. In: A. SW, Lauterbach KW, Joost HG, editors. *Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG: Deutsche Diabetes-Gesellschaft*; 2001.
- Kim MS, Polychronakos C. Immunogenetics of type 1 diabetes. *Horm Res* 2005;64(4):180-8.
- Kimmel SE, Ward CR, Henthorn PS, Hess RS. Familial insulin-dependent diabetes mellitus in Samoyed dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2002;38(3):235-8.
- Kloppel G, Bommer G, Commandeur G, Heitz P. The endocrine pancreas in chronic pancreatitis. Immunocytochemical and ultrastructural studies. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1978;377(2):157-74.
- Kramer JW, Nottingham S, Robinette J, Lenz G, Sylvester S, Dessouky MI. Inherited, early onset, insulin-requiring diabetes mellitus of Keeshond dogs. *Diabetes* 1980;29(7):558-65.
- Kramer JW, Klaassen JK, Baskin DG, Prieur DJ, Rantanen NW, Robinette JD, Graber WR, Rashti L. Inheritance of diabetes mellitus in Keeshond dogs. *Am J Vet Res* 1988;49(3):428-31.
- Latimer KS, Mahaffey EA. Neutrophil adherence and movement in poorly and well-controlled diabetic dogs. *Am J Vet Res* 1984;45(8):1498-500.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Prinzipien der Biochemie*. 2 ed. Heidelberg Berlin Oxford: Spektrum Akademischer Verlag GmbH 1994.
- Li YC, Qiao G, Uskokovic M, Xiang W, Zheng W, Kong J. Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89-90(1-5):387-92.
- Lightman S. Does aldose reductase have a role in the development of the ocular complications of diabetes? *Eye* 1993;7 ( Pt 2):238-41.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, Clamp M, Chang JL, Kulbokas EJ, 3rd, Zody MC, Mauceli E, Xie X, Breen M,

- Wayne RK, Ostrander EA, Ponting CP, Galibert F, Smith DR, DeJong PJ, Kirkness E, Alvarez P, Biagi T, Brockman W, Butler J, Chin CW, Cook A, Cuff J, Daly MJ, DeCaprio D, Gnerre S, Grabherr M, Kellis M, Kleber M, Bardeleben C, Goodstadt L, Heger A, Hitte C, Kim L, Koepfli KP, Parker HG, Pollinger JP, Searle SM, Sutter NB, Thomas R, Webber C, Baldwin J, Abebe A, Abouelleil A, Aftuck L, Ait-Zahra M, Aldredge T, Allen N, An P, Anderson S, Antoine C, Arachchi H, Aslam A, Ayotte L, Bachantsang P, Barry A, Bayul T, Benamara M, Berlin A, Bessette D, Blitshteyn B, Bloom T, Blye J, Boguslavskiy L, Bonnet C, Boukhgalter B, Brown A, Cahill P, Calixte N, Camarata J, Cheshatsang Y, Chu J, Citroen M, Collymore A, Cooke P, Dawoe T, Daza R, Decktor K, DeGray S, Dhargay N, Dooley K, Dorje P, Dorjee K, Dorris L, Duffey N, Dupes A, Egbiremolen O, Elong R, Falk J, Farina A, Faro S, Ferguson D, Ferreira P, Fisher S, FitzGerald M, Foley K, Foley C, Franke A, Friedrich D, Gage D, Garber M, Gearin G, Giannoukos G, Goode T, Goyette A, Graham J, Grandbois E, Gyaltsen K, Hafez N, Hagopian D, Hagos B, Hall J, Healy C, Hegarty R, Honan T, Horn A, Houde N, Hughes L, Hunnicutt L, Husby M, Jester B, Jones C, Kamat A, Kanga B, Kells C, Khazanovich D, Kieu AC, Kisner P, Kumar M, Lance K, Landers T, Lara M, Lee W, Leger JP, Lennon N, Leuper L, LeVine S, Liu J, Liu X, Lokyitsang Y, Lokyitsang T, Lui A, Macdonald J, Major J, Marabella R, Maru K, Matthews C, McDonough S, Mehta T, Meldrim J, Melnikov A, Meneus L, Mihalev A, Mihova T, Miller K, Mittelman R, Mlenga V, Mulrain L, Munson G, Navidi A, Naylor J, Nguyen T, Nguyen N, Nguyen C, Nicol R, Norbu N, Norbu C, Novod N, Nyima T, Olandt P, O'Neill B, O'Neill K, Osman S, Oyono L, Patti C, Perrin D, Phunkhang P, Pierre F, Priest M, Rachupka A, Raghuraman S, Rameau R, Ray V, Raymond C, Rege F, Rise C, Rogers J, Rogov P, Sahalie J, Settipalli S, Sharpe T, Shea T, Sheehan M, Sherpa N, Shi J, Shih D, Sloan J, Smith C, Sparrow T, Stalker J, Stange-Thomann N, Stavropoulos S, Stone C, Stone S, Sykes S, Tchuinga P, Tenzing P, Tesfaye S, Thoulutsang D, Thoulutsang Y, Topham K, Topping I, Tsamla T, Vassiliev H, Venkataraman V, Vo A, Wangchuk T, Wangdi T, Weiland M, Wilkinson J, Wilson A, Yadav S, Yang S, Yang X, Young G, Yu Q, Zainoun J, Zembek L, Zimmer A, Lander ES. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 2005;438(7069):803-19.
- Lippmann T, Pasternack SM, Kraczyk B, Dudek SE, Dekomien G. Indirect exclusion of four candidate genes for generalized progressive retinal atrophy in several breeds of dogs. *J Negat Results Biomed* 2006;5:19.
- Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;92(1):4-8.
- Livingstone C, Collison M. Sex steroids and insulin resistance. *Clin Sci (Lond)* 2002;102(2):151-66.
- Löffler G. *Basiswissen Biochemie*. 6 ed. Heidelberg: Springer Verlag 2005.
- Loste A, Marca MC. Fructosamine and glycated hemoglobin in the assessment of glycaemic control in dogs. *Vet Res* 2001;32(1):55-62.
- Macintire DK. Emergency therapy of diabetic crises: insulin overdose, diabetic ketoacidosis, and hyperosmolar coma. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1995;25(3):639-50.
- Mansfield L. The reading, writing, and arithmetic of the medical literature, part 2: critical evaluation of statistical reporting. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005;95(4):315-21; quiz 22, 80.
- Marron MP, Raffel LJ, Garchon HJ, Jacob CO, Serrano-Rios M, Martinez Larrad MT, Teng WP, Park Y, Zhang ZX, Goldstein DR, Tao YW, Beaurain G, Bach JF, Huang HS, Luo DF, Zeidler A, Rotter JI, Yang MC, Modilevsky T, Maclaren NK,

- She JX. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) is associated with CTLA4 polymorphisms in multiple ethnic groups. *Hum Mol Genet* 1997;6(8):1275-82.
- Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 2005;48(7):1247-57.
- Mattheeuws D, Rottiers R, Kaneko JJ, Vermeulen A. Diabetes mellitus in dogs: relationship of obesity to glucose tolerance and insulin response. *Am J Vet Res* 1984;45(1):98-103.
- Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, Inoue Y, Morita K, Takeda E, Pike JW. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Mol Endocrinol* 1997;11(8):1165-79.
- Monroe WE, Laxton D, Fallin EA, Richter KP, Santen DR, Panciera DL, Towell TL, Williams KA, Hart JR, Hill S, Finkler MR, Shinn JS. Efficacy and safety of a purified porcine insulin zinc suspension for managing diabetes mellitus in dogs. *J Vet Intern Med* 2005;19(5):675-82.
- Mosimann W, Kohler T. Verdauungsorgane. In: Mosimann W, Kohler T, editors. *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere*. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey; 1990. p. 175-6.
- Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernan MA, Olek MJ, Willett WC, Ascherio A. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 2004;62(1):60-5.
- Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 2005;26(5):662-87.
- Nejentsev S, Cooper JD, Godfrey L, Howson JM, Rance H, Nutland S, Walker NM, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Undlien DE, Ronningen KS, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Gillespie KM, Ring SM, Strachan DP, Widmer B, Dunger D, Todd JA. Analysis of the vitamin D receptor gene sequence variants in type 1 diabetes. *Diabetes* 2004;53(10):2709-12.
- Nelson RW. Diabetes Mellitus. In: Ettinger SJ, Feldman EC, editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. St. Louis: Elsevier Saunders; 2005. p. 1563-91.
- Newman B, Selby JV, King MC, Slemenda C, Fabsitz R, Friedman GD. Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia* 1987;30(10):763-8.
- Nguyen TM, Lieberherr M, Fritsch J, Guillozo H, Alvarez ML, Fitouri Z, Jehan F, Garabedian M. The rapid effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 require the vitamin D receptor and influence 24-hydroxylase activity: studies in human skin fibroblasts bearing vitamin D receptor mutations. *J Biol Chem* 2004;279(9):7591-7.
- Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, Van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, Larrad MT, Rios MS, Chow CC, Cockram CS, Jacobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Tosi R, Pozzilli P, Todd JA. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. *Hum Mol Genet* 1996;5(7):1075-80.
- Norman AW. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 2006;147(12):5542-8.
- Norman EJ, Wolsky KJ, MacKay GA. Pregnancy-related diabetes mellitus in two dogs. *N Z Vet J* 2006;54(6):360-4.
- Nossal GJ. Somatic mutations in B lymphocytes: new perspectives in tolerance research? *Immunol Cell Biol* 1988;66 ( Pt 2):105-10.
- Nossal GJ. Molecular and cellular aspects of immunologic tolerance. *Eur J Biochem* 1991;202(3):729-37.

- Omdahl JL, Morris HA, May BK. Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. *Annu Rev Nutr* 2002;22:139-66.
- Onengut-Gumuscu S, Concannon P. The genetics of type 1 diabetes: lessons learned and future challenges. *J Autoimmun* 2005;25 Suppl:34-9.
- Ono SJ. Immunity in the eye: lessons in organ-specific responses. *J Leukoc Biol* 2003;74(2):149-50.
- Panda DK, Miao D, Bolivar I, Li J, Huo R, Hendy GN, Goltzman D. Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem* 2004;279(16):16754-66.
- Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH, Badenhoop K. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* 2000;49(3):504-7.
- Parker SP, Quinlivan M, Taha Y, Breuer J. Genotyping of varicella-zoster virus and the discrimination of Oka vaccine strains by TaqMan real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2006;44(11):3911-4.
- Peikes H, Morris DO, Hess RS. Dermatologic disorders in dogs with diabetes mellitus: 45 cases (1986-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2001;219(2):203-8.
- Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M. Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;71(2):169-75.
- Perez MI, Kohn SR. Cutaneous manifestations of diabetes mellitus. *J Am Acad Dermatol* 1994;30(4):519-31; quiz 32-4.
- Persaud DR, Barranco-Mendoza A. Bovine serum albumin and insulin-dependent diabetes mellitus; is cow's milk still a possible toxicological causative agent of diabetes? *Food Chem Toxicol* 2004;42(5):707-14.
- Plotnick AN, Greco DS. Diagnosis of diabetes mellitus in dogs and cats. Contrasts and comparisons. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1995;25(3):563-70.
- Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* 2004;29(12):664-73.
- Rahbar S. The discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1043:9-19.
- Rand JS, Fleeman LM, Farrow HA, Appleton DJ, Lederer R. Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture? *J Nutr* 2004;134(8 Suppl):2072S-80S.
- Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, Cyopick P, Danska JS, Delovitch TL. Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1993;178(1):87-99.
- Rathmell JC, Fournier S, Weintraub BC, Allison JP, Goodnow CC. Repression of B7.2 on self-reactive B cells is essential to prevent proliferation and allow Fas-mediated deletion by CD4(+) T cells. *J Exp Med* 1998;188(4):651-9.
- Redondo MJ, Yu L, Hawa M, Mackenzie T, Pyke DA, Eisenbarth GS, Leslie RD. Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia* 2001;44(3):354-62.
- Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med* 2005;22(4):359-70.
- Reis AF, Hauache OM, Velho G. Vitamin D endocrine system and the genetic susceptibility to diabetes, obesity and vascular disease. A review of evidence. *Diabetes Metab* 2005;31(4 Pt 1):318-25.

- Reusch CE, Liehs MR, Hoyer M, Vochezer R. Fructosamine. A new parameter for diagnosis and metabolic control in diabetic dogs and cats. *J Vet Intern Med* 1993;7(3):177-82.
- Reusch CE, Haberer B. Evaluation of fructosamine in dogs and cats with hypo- or hyperproteinaemia, azotaemia, hyperlipidaemia and hyperbilirubinaemia. *Vet Rec* 2001;148(12):370-6.
- Riachy R, Vandewalle B, Moerman E, Belaich S, Lukowiak B, Gmyr V, Muharram G, Kerr Conte J, Pattou F. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 protects human pancreatic islets against cytokine-induced apoptosis via down-regulation of the Fas receptor. *Apoptosis* 2006;11(2):151-9.
- Roche EF, Menon A, Gill D, Hoey H. Clinical presentation of type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2005;6(2):75-8.
- Ruoff WW, Baker DC, Morgan SJ, Abbitt B. Type II diabetes mellitus in a horse. *Equine Vet J* 1986;18(2):143-4.
- Sai P, Debray-Sachs M, Jondet A, Gepts W, Assan R. Anti-beta-cell immunity in insulinopenic diabetic dogs. *Diabetes* 1984;33(2):135-40.
- Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005;16 Suppl 1:S30-3.
- Schmidt-Gayk H, Bouillon R, Roth HJ. Measurement of vitamin D and its metabolites (calcidiol and calcitriol) and their clinical significance. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1997;227:35-45.
- Schummer A, Habermehl K-H. Verdauungsapparat. In: Habermehl K-H, Vollmerhaus B, Wilkens H, editors. *Anatomie der Haussäugetiere*. Berlin, Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag; 1995. p. 146f.
- Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, Rijnberk A. Progestin treatment in the dog. I. Effects on growth hormone, insulin-like growth factor I and glucose homeostasis. *Eur J Endocrinol* 1994;131(4):413-21.
- Selman PJ, Mol JA, Rutteman GR, van Garderen E, van den Ingh TS, Rijnberk A. Effects of progestin administration on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and glucose homeostasis in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 1997;51:345-54.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116(7):1793-801.
- Silverman M, Turner RJ. Section 8: Renal Physiology. In: Windhager EE, editor. *Handbook of Physiology*. Oxford: Oxford University Press; 1992. p. 2017-38.
- Singh NJ, Chen C, Schwartz RH. The impact of T cell intrinsic antigen adaptation on peripheral immune tolerance. *PLoS Biol* 2006;4(11):e340.
- Sinowatz F. Endokrine Drüsen. In: Hees H, Sinowatz F, editors. *Histologie: Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. 3 ed. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH; 2000. p. 448-51.
- Skelly BJ, Franklin RJ. Mutations in genes causing human familial isolated hyperparathyroidism do not account for hyperparathyroidism in Keeshond dogs. *Vet J* 2006.
- Smith LF. Species variation in the amino acid sequence of insulin. *Am J Med* 1966;40(5):662-6.
- Smyth D, Cooper JD, Collins JE, Heward JM, Franklyn JA, Howson JM, Vella A, Nutland S, Rance HE, Maier L, Barratt BJ, Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Dunger DB, Widmer B, Strachan DP, Ring SM, Walker N, Clayton DG, Twells RC, Gough SC, Todd JA. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 2004;53(11):3020-3.



- Soller JT, Murua Escobar H, Janssen M, Fork M, Bullerdiek J, Nolte I. Cytokine genes single nucleotide polymorphism (SNP) screening analyses in canine malignant histiocytosis. *Anticancer Res* 2006;26(5A):3417-20.
- Sonksen P, Sonksen J. Insulin: understanding its action in health and disease. *Br J Anaesth* 2000;85(1):69-79.
- Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr Rev* 2005;26(3):380-92.
- Stassi G, De Maria R, Trucco G, Rudert W, Testi R, Galluzzo A, Giordano C, Trucco M. Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1997;186(8):1193-200.
- Steinborn R, Zakhartchenko V, Wolf E, Muller M, Brem G. Non-balanced mix of mitochondrial DNA in cloned cattle produced by cytoplasm-blastomere fusion. *FEBS Lett* 1998;426(3):357-61.
- Stene LC, Joner G. Use of cod liver oil during the first year of life is associated with lower risk of childhood-onset type 1 diabetes: a large, population-based, case-control study. *Am J Clin Nutr* 2003;78(6):1128-34.
- Stokes WS. Spontaneous diabetes mellitus in a baboon (*Papio cynocephalus anubis*). *Lab Anim Sci* 1986;36(5):529-33.
- Storm TL, Sorensen OH, Lund B, Christiansen JS, Andersen AR, Lumholtz IB, Parving HH. Vitamin D metabolism in insulin-dependent diabetes mellitus. *Metab Bone Dis Relat Res* 1983;5(3):107-10.
- Strippoli GF, Di Paolo S, Cincione R, Di Palma AM, Teutonico A, Grandaliano G, Schena FP, Gesualdo L. Clinical and therapeutic aspects of diabetic nephropathy. *J Nephrol* 2003;16(4):487-99.
- Taniyama H, Shirakawa T, Furuoka H, Osame S, Kitamura N, Miyazawa K. Spontaneous diabetes mellitus in young cattle: histologic, immunohistochemical, and electron microscopic studies of the islets of Langerhans. *Vet Pathol* 1993;30(1):46-54.
- Thorsby E, Lie BA. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. *Transpl Immunol* 2005;14(3-4):175-82.
- Todaro M, Zeuner A, Stassi G. Role of apoptosis in autoimmunity. *J Clin Immunol* 2004;24(1):1-11.
- Toskes PP. Hyperlipidemic pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am* 1990;19(4):783-91.
- Turpeinen H, Hermann R, Vaara S, Laine AP, Simell O, Knip M, Veijola R, Ilonen J. Vitamin D receptor polymorphisms: no association with type 1 diabetes in the Finnish population. *Eur J Endocrinol* 2003;149(6):591-6.
- Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R, Goodyer CG, Wickramasinghe S, Colle E, Polychronakos C. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet* 1997;15(3):289-92.
- Vaidya B, Pearce S. The emerging role of the CTLA-4 gene in autoimmune endocrinopathies. *Eur J Endocrinol* 2004;150(5):619-26.
- Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orru V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Tasken K, Cucca F, Mustelin T, Bottini N. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet* 2005;37(12):1317-9.
- Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation: role in the pathogenesis of diabetic complications. *Clin Chem* 1986;32(10 Suppl):B37-41.
- von Boehmer H, Kisielow P. Negative selection of the T-cell repertoire: where and when does it occur? *Immunol Rev* 2006;209:284-9.

- Walbango H, Dover B, Jazz H, Dennsevilla L, Lee KC, Chen MC, Tai TY, Chuang LM. References are hardly ever doublechecked in scientific publications. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;52(5):575-80.
- Watson PJ. Exocrine pancreatic insufficiency as an end stage of pancreatitis in four dogs. *J Small Anim Pract* 2003;44(7):306-12.
- Whiting SJ, Calvo MS. Dietary recommendations for vitamin D: a critical need for functional end points to establish an estimated average requirement. *J Nutr* 2005;135(2):304-9.
- Wikvall K. Cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of vitamin D to its hormonal form (review). *Int J Mol Med* 2001;7(2):201-9.
- Wilke VL, Conzemius MC, Rothschild MF. SNP detection and association analyses of candidate genes for rupture of the cranial cruciate ligament in the dog. *Anim Genet* 2005;36(6):519-21.
- Wilkie DA, Gemensky-Metzler AJ, Colitz CM, Bras ID, Kuonen VJ, Norris KN, Basham CR. Canine cataracts, diabetes mellitus and spontaneous lens capsule rupture: a retrospective study of 18 dogs. *Vet Ophthalmol* 2006;9(5):328-34.
- Wohlke A, Distl O, Drogemuller C. Characterization of the canine CLCN3 gene and evaluation as candidate for late-onset NCL. *BMC Genet* 2006;7:13.
- Xiao XH, Liu ZL, Wang H, Sun Q, Li WH, Yang GH, Liu QY. Effects of vitamin D receptor gene polymorphisms on susceptibility to type 1 diabetes mellitus. *Chin Med Sci J* 2006;21(2):95-8.
- Yamada S, Shimizu M, Yamamoto K. Structure-function relationships of vitamin D including ligand recognition by the vitamin D receptor. *Med Res Rev* 2003;23(1):89-115.
- Yamamoto M, Kawanobe Y, Takahashi H, Shimazawa E, Kimura S, Ogata E. Vitamin D deficiency and renal calcium transport in the rat. *J Clin Invest* 1984;74(2):507-13.
- Yeager M, Hughes AL. Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination, and convergent evolution. *Immunol Rev* 1999;167:45-58.
- Yuzbasiyan-Gurkan V, Blanton SH, Cao Y, Ferguson P, Li J, Venta PJ, Brewer GJ. Linkage of a microsatellite marker to the canine copper toxicosis locus in Bedlington terriers. *Am J Vet Res* 1997;58(1):23-7.
- Zangerl B, Goldstein O, Philp AR, Lindauer SJ, Pearce-Kelling SE, Mullins RF, Graphodatsky AS, Ripoll D, Felix JS, Stone EM, Acland GM, Aguirre GD. Identical mutation in a novel retinal gene causes progressive rod-cone degeneration in dogs and retinitis pigmentosa in humans. *Genomics* 2006;88(5):551-63.
- Zekzer D, Wong FS, Wen L, Altieri M, Gurlo T, von Grafenstein H, Sherwin RS. Inhibition of diabetes by an insulin-reactive CD4 T-cell clone in the nonobese diabetic mouse. *Diabetes* 1997;46(7):1124-32.
- Zheng W, She JX. Genetic association between a lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) and type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54(3):906-8.
- Zicker SC, Nelson RW, Ford RB, Kirk CA. Endocrine diseases and disorders of lipid metabolism. In: Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL, Roudebush P, editors. *Small Animal Clinical Nutrition*, 4th edition. Topeka, KA: Mark Morris Institute; 2000. p. 1328-40.

## **Danksagung**

Ich danke...

- Prof. Dr. Katrin Hartmann für die exzellente und engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit, und ganz besonders Dr. Karin Weber für wissenschaftliche und praktische Beratung bei allen Problemen.
- Karin Begsteiger und Sieglinde Hirmer für Hilfe und gute Laune im Labor.
- Prof. Dr. Ralf Steinborn, Dr. Felix Neuerer und Prof. Dr. Dr. Reinhold Erben.
- dem Graduiertenkolleg 1029, allen Stipendiaten, vor allem Susanna und Bernhard für die nette Unterstützung in Wien.
- Dr. Florian Zeugswetter, Christina Wondratschek und Dr. Christiane Kafarnik für das Probensammeln.
- allen Kolleginnen und Kollegen der Medizinischen Kleintierklinik, ganz besonders Liese, Tina, Isa, Markus, Stefan und Astrid für zwei tolle Jahre in der Klinik.
- Sylvia, Tina, Simon, Gregor, Chris, Joachim, Till und Anne, Britta; weil es ohne Euch keinen Spaß machen würde.

Ganz besonders möchte ich mich aber bei meinem Vater für 29 Jahre Unterstützung, Ermutigung und Freundschaft bedanken!

**Diese Arbeit wurde gefördert vom Graduiertenkolleg 1029 „Funktionale Genomforschung in der Tiermedizin“ der DFG**